

Effektivität und Toxizität von Tyrosinkinase-Inhibitoren beim
felines Injektionsstellen-assoziierten Sarkom und caninen
epitheliotropen Lymphom

von Nadine Holtermann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Effektivität und Toxizität von Tyrosinkinase-Inhibitoren beim
felines Injektionsstellen-assoziierten Sarkom und caninen
epitheliotropen Lymphom

von Nadine Holtermann

aus Hünfeld

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes
Hirschberger

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das feline Injektionsstellen-assoziierte Sarkom	2
1.1.	Geschichte, Ätiologie und Pathogenese	2
1.2.	Inzidenz	9
1.3.	Klinisches Bild	10
1.4.	Histologisches Bild	11
1.5.	Metastasierungsverhalten	12
1.6.	Diagnostisches Vorgehen	12
1.7.	Therapie	14
1.7.1.	Chirurgie	14
1.7.2.	Radiotherapie	16
1.7.3.	Zytostatische Therapie und Elektrochemotherapie	19
1.7.4.	Unspezifische Immuntherapie	22
1.7.5.	Immunologische Gentherapie	23
1.7.6.	Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren	25
1.8.	Prognose	26
2.	Das canine epitheliotrope T-Zell-Lymphom	27
2.1.	Geschichte, Ätiologie, Pathogenese	29
2.2.	Inzidenz	31
2.3.	Klinisches Bild	31
2.4.	Histologisches Bild	34
2.5.	Diagnostisches Vorgehen	38
2.6.	Therapie	40
2.6.1.	Lokale Therapie	40
2.6.2.	Systemische Therapie	43
2.7.	Prognose	47
3.	Rezeptortyrosinkinasen	47
3.1.	Der <i>Platelet-derived growth</i> -Faktor und sein Rezeptor	49
3.1.1.	Aufbau und Expression	49
3.1.2.	Physiologische Funktion	50
3.1.3.	Die Rolle von Rezeptor und Ligand in der Onkogenese	51

3.2.	Der <i>Vascular endothelial growth</i> -Faktor und sein Rezeptor	53
3.2.1.	Aufbau und Expression	53
3.2.2.	Physiologische Funktion	55
3.2.3.	Rolle von Rezeptor und Liganden in der Onkogenese.....	56
3.3.	Kit und sein Ligand Stammzellfaktor	58
3.3.1.	Aufbau und Expression	58
3.3.2.	Physiologische Funktion	60
3.3.3.	Die Rolle von Kit und seinem Liganden in der Onkogenese.....	61
4.	Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	63
4.1.	Allgemeines.....	63
4.2.	Toceranib.....	64
4.3.	Masitinib.....	69
III.	PUBLIKATIONEN.....	73
1.	<i>Letter of acceptance</i> zu dem Artikel „ <i>The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and site effects</i> “	73
2.	Der Artikel „ <i>The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and site effects</i> “	74
3.	<i>Letter of acceptance</i> zu dem Artikel „ <i>Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma</i> “	83
4.	Der Artikel „ <i>Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma</i> “	84
IV.	DISKUSSION	93
1.	Der Tyrosinkinaseinhibitor Toceranib bei feline Injektionsstellen-assozierten Sarkomen	93
2.	Masitinib-Monotherapie beim caninen epitheliotropen Lymphom ...	99
V.	ZUSAMMENFASSUNG	106
VI.	SUMMARY.....	108
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	109
VIII.	DANKSAGUNG	170

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCB1	ATP-binding cassette transporter B 1
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of Differentiation
CETL	Canine epitheliotropic lymphoma
CR	Complete remission
CSF-1	Colony-stimulating factor 1
CT	Computertomographie
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	Europeane medicine agency
feGM-CSF	Feline granulocyte macrophages colony-stimulation factor
feIFN- ω	Felines Interferon- ω
feIL-2	Felines Interleukin 2
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISS	Feline injectionsite
FIV	Felines Immundefizienzvirus
Flk-1	Fatal liver kinase 1
Flt-1	fms-like tyrosinekinase 1
Flt-4	fms-like tyrosinekinase 4
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GH	Growth hormone
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HTLV-1	Humanen T-lymphotropes Virus 1
huIL-2	Humanes Interleukin 2
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratumoral
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IFN- ω	Interferon- ω
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin 2
KDR	Kinase domaine region
MDR	Multi drug resistance
MF	Mycosis fungoides
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
PARR	Polymerase chain reaction for antigenetic rearrangements
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PIGF	Placental growth factor
PR	Pagetoide RetikULOse

PR	Progressive disease
RCP	Rhinotracheitis, Calicivirus, Panleukopenievirus
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCF	Stem cell factor
SD	Stable disease
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription 3
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- α/β	Transforming growth factor α/β
Thy-1	Thymocyte differentiation antigene 1
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TNF- β R	Tumornekrosefaktor- β Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zellen
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World health organisation

I. EINLEITUNG

Tyrosinkinase-Inhibitoren gehören zu einer in der Tiermedizin noch relativ neuen Wirkstoffklasse und sind zurzeit durch Masitinib (Masivet® der Firma AB Science), sowie Toceranib (Palladia® der Firma Zoetis) auf dem deutschen Markt vertreten. Beide sind zur Behandlung caniner Mastzelltumoren zugelassen. In den Studien dieser Arbeit sollte eruiert werden, ob das Indikationsspektrum dieser *targeted therapy* erweitert werden kann. Zu diesem Zweck wurden Katzen mit einem nicht-operablen Fibrosarkom und Hunde mit einem epitheliotropen Lymphom mit Toceranib, bzw. Masitinib behandelt.

Das feline Fibrosarkom ist ein häufiger kutaner Tumor, der sich vor allem durch sein lokal hochgradig invasives Wachstum und die hohe Rezidivrate auszeichnet. Die ideale Therapie besteht zurzeit aus einer Kombination mehrerer Verfahren, wobei die möglichst vollständige chirurgische Entfernung immer noch die wichtigste Maßnahme darstellt. Allerdings gibt es keine kurativen Therapiemöglichkeiten, wenn der Tumor bereits eine gewisse Größe erreicht hat und eine chirurgische Exstirpation nicht mehr möglich ist bzw. bereits Metastasen in der Lunge vorliegen.

Das epitheliotrope T-Zell-Lymphom stellt eine eher seltene Sonderform des Lymphoms beim Hund dar und auch hier wurde noch keine wirklich zufriedenstellende Standardtherapie gefunden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das feline Injektionsstellen-assoziierte Sarkom

1.1. Geschichte, Ätiologie und Pathogenese

Das sogenannte injektions- beziehungsweise vakzine-assoziierte Sarkom (aus dem Englischen *feline injection site sarcoma* im Folgenden abgekürzt mit FISS) wurde 1991 erstmals beschrieben. Damals fiel den Autoren auf, dass mit der Einführung der verpflichtenden Tollwutimpfung 1987 die Inzidenz von Impfreaktionen deutlich anstieg. Der damals neu auf den Markt gebrachte Tollwutimpfstoff wurde nun vorwiegend subkutan appliziert, was vor dem Jahr 1987 noch keine gängige Praxis darstellte. So fiel HENDRICK und DUNAGAN auf, dass nach Tollwutimpfungen nekrotisierende, granulomatöse Pannikulitiden bei Katzen auftraten (HENDRICK & DUNAGAN, 1991). Zuvor waren solche Impfreaktionen in der Tiermedizin ausschließlich bei Hunden dokumentiert worden (WILCOCK & YAGER, 1986). Da die Fibrosarkome nun in großer Zahl an typischen Impflokalisationen auftraten, lag der Verdacht nahe, es bestünde ein kausaler Zusammenhang zwischen der subkutanen Applikation der Vakzine, granulomatösen Pannikulitiden und der Entstehung von FISS (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Zusätzlich wurde im gleichen Zeitraum die neue inaktivierte FeLV-Vakzine in den USA eingeführt. Eine retrospektive Studie zeigte, dass in der Zeit von Juli 1988 bis Juni 1994 das Verhältnis von impf-assoziierten Sarkomen zu Sarkomen an anderen Lokalisationen um das Achtfache anstieg (DODDY et al., 1996).

Schon bei den ersten histologischen Untersuchungen der FISS fielen den Pathologen Makrophagen auf, die graubraunes Material phagozytiert hatten (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Ein Jahr später wurde diese Substanz mit Hilfe von Elektronenmikroskopie als Aluminium identifiziert (HENDRICK et al., 1992), ein Element, das häufig als Adjuvans in Impfstoffen verwendet wird. Eine Untersuchung von 20 FISS mittels Röntgenspektroskopie bestätigte dieses Ergebnis fast 10 Jahre später. Dabei wurde in 5 der analysierten Sarkome kristallines, aluminiumhaltiges Material in tumorassoziierten Makrophagen gefunden (MADEWELL et al., 2001). Es wurde nun postuliert, dass gerade die

Adjuvanzen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Impfreaktionen und letztendlich der Neoplasien spielten. Dieser Zusammenhang wurde in mehreren Studien ebenfalls bestärkt (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK et al., 1992; KASS et al., 1993; HENDRICK et al., 1994b; MACY & HENDRICK, 1996). Es wurde auch diskutiert, ob die Immunstimulation durch die jeweiligen Impfantigene und nicht das Adjuvans als auslösendes Agens der Entzündung und schließlich der Transformation fungiert (MACY & HENDRICK, 1996). Bisher konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden, ob Aluminium tatsächlich das Triggerelement der Kanzerogenese darstellt oder sich lediglich im Bereich der Tumoren findet, weil es dort nach der Impfung verblieben ist (HENDRICK et al., 1992; MACY & HENDRICK, 1996; MACY, 1997; MADEWELL et al., 2001; MCENTEE & PAGE, 2001). Der ursprüngliche Verdacht, dass die neue inaktivierte Tollwutvakzine das auslösende Agens in der Pathogenese darstellte, wurde wiederholt bestätigt (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK et al., 1992; DUBIELZIG et al., 1993; KASS et al., 1993). Allerdings erbrachten KASS und Mitarbeiter 1993 den Nachweis, dass auch der FeLV-Impfstoff zur Entstehung von Sarkomen führen kann (KASS et al., 1993). Darüber hinaus wurde in einer späteren Studie erkannt, dass an FISS erkrankte Katzen signifikant häufiger subkutan gegen FeLV geimpft worden waren. Zudem wurden in dieser Analyse auch eine Impfreaktion und ein daraus resultierender Tumor an einer Lokalisation dokumentiert, an der Impfungen gegen feline virale Rhinotracheitis, Calicivirus und Panleukopenie (RCP) appliziert worden waren (HENDRICK et al., 1994b). In den folgenden Jahren wurde dieser Zusammenhang gleich von mehreren Autoren ebenfalls vermutet (LESTER et al., 1996; BURTON & MASON, 1997; COYNE et al., 1997). Zehn Jahre später berichteten DE MAN und DUCATELLE von einem bilateralen FISS bei einer Katze, deren RCP-Immunisierung links thorakal und die RCP-Boosterung an der rechten Thoraxwand appliziert worden war (DE MAN & DUCATELLE, 2007). Somit ist ein kausaler Zusammenhang zwischen jeder feline Vakzine und den FISS nicht von der Hand zu weisen. Dabei scheinen die Art des Impfstoffs sowie der Herstellungskonzern keine Rolle zu spielen (HENDRICK et al., 1994b). 1999 wurden alle adjuvanshaltigen Impfstoffe für Katzen von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als potentiell kanzerogen eingestuft, da der Zusammenhang ihrer Administration und der Kanzerogenese statistisch erwiesen war (MCNIEL, 2001). Dahingegen rufen adjuvansfreie

Impfstoffe kaum Entzündungsreaktionen hervor (DAY et al., 2007).

Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Vakzinen, sondern auch andere Stoffe wie langwirksame Injektionslösungen, beispielsweise Penicillin und Methylprednisolonacetat (GAGNON, 2000; KASS et al., 2003), sowie nicht-resorbierbares Nahtmaterial (BURACCO et al., 2002), die eine chronische Entzündungsreaktion provozieren, zur Entartung der mesenchymalen Zellen führen können. Des Weiteren gibt es Fallberichte von Katzen, die nach subkutaner Injektion des Langzeitantiparasitikums Lufenuron sowie nach Applikation lokaler Ektoparasitika, sogenannter spot on-Präparate FISS entwickelten (ESPLIN et al., 1999; DYER et al., 2007). In einem anderen Fall wurde eine Katze mit FISS nach intraabdominaler Retention eines chirurgischen Schwammes vorgestellt (HADDAD et al., 2010). Weitere Fallberichte wurden von Katzen veröffentlicht, die an Lokalisationen ein Fibrosarkom entwickelten, an denen ein Mikrochip zur individuellen Identifikation implantiert worden war. Der Mikrochip grenzte direkt an das Tumorgewebe an, eine entzündliche Reaktion konnte aber weder makroskopisch noch mikroskopisch festgestellt werden (DALY et al., 2008; CARMINATO et al., 2011). 2006 war bereits von einem Hund berichtet worden, der ein Fibrosarkom an seiner Mikrochip-Implantationsstelle ausgebildet hatte. Dieser Tumor präsentierte sich histologisch entsprechend den feline Sarkomen (VASCELLARI et al., 2006). Eine ungeimpfte Katze entwickelte innerhalb von Wochen nach der einmaligen Injektion von Meloxicam ein FISS (MUNDAY et al., 2011). SRIVASTAV und Mitarbeiter konnten jedoch mittlerweile bestätigen, dass das Risiko für FISS nach Impfungen signifikant höher liegt als nach anderen Injektionen. Zusätzlich bewies die Arbeitsgruppe, dass wiederum adjuvante inaktivierte Vakzinen signifikant häufiger mit FISS assoziiert sind als andere Impfstoffe (SRIVASTAV et al., 2012).

Die durch die Agenzien hervorgerufene lokale Entzündung scheint eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese zu spielen, da sie eine chronische Entzündung und überschießende Immunreaktion provoziert. Dies führt dann zu unkontrollierter Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten, aus der, bei genetisch prädisponierten Katzen, die neoplastische Transformation der Zellen resultieren kann (HENDRICK, 1999; MCENTEE & PAGE, 2001; MCNIEL, 2001; MORRISON & STARR, 2001). Das Vorliegen von Myofibroblasten, die

physiologischerweise in Granulationsgewebe ausdifferenzieren, in FISS hebt den Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und subkutanen Traumata weiter hervor (GABBIANI et al., 1972; DUBIELZIG et al., 1993; MADEWELL et al., 2001; MARTANO et al., 2011). Diese Theorie wird auch durch histopathologisch festgestellte Übergangszonen von Entzündung zu Sarkom in Tumorexstirpaten unterstützt (HENDRICK et al., 1992). 2004 erkannten SORENSEN und Mitarbeiter, dass die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), im Speziellen der MMP2 und der Membrantyp MMP16, in FISS negativ mit der Gesamtüberlebenszeit korreliert. Diese Endopeptidasen werden von Fibroblasten und Entzündungszellen während des Wundheilungsprozesses zur Verfügung gestellt. Sie werden mit aggressivem biologischem Verhalten von Neoplasien in Verbindung gebracht und sind mit hoher Invasivität und Metastasierung assoziiert (SOERENSEN et al., 2004). Verschiedene Tiermodelle konnten ebenfalls die Zusammenhänge zwischen Irritation, Inflammation und Tumorgenese beweisen (DOLBERG et al., 1985; SCHUH et al., 1990; MARTINS-GREEN et al., 1994; MACY & HENDRICK, 1996). Auch die Entwicklung intraokulärer Sarkome in Folge okulärer Traumata oder chronischer Uveitis könnten diese Hypothese bestärken (DUBIELZIG, 1984; DUBIELZIG et al., 1990; ZEISS et al., 2003).

Die neoplastische Entartung der Fibroblasten und Myofibroblasten wird durch verschiedene Mechanismen, wie die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen induziert (HENDRICK & BROOKS, 1994). Mutationen des Tumorsuppressor-Gens p53 spielen eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese vieler Neoplasien und führen zu aggressiverem biologischem Verhalten (LEVINE, 1997; HANAHAN & WEINBERG, 2000). Einige Studien haben sich bereits mit der Untersuchung von FISS und deren Expression des p53-Gens befasst (MAYR et al., 1995; MAYR et al., 1998; GOAD et al., 1999; MAYR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2001; NIETO et al., 2003; HERSHEY et al., 2005; BANERJI & KANJILAL, 2006; BANERJI et al., 2007). Dabei wurden Punktmutationen des Gens in FISS-Zellen nachgewiesen, die in physiologischen Zellen derselben Katzen nicht vorhanden waren (MAYR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2001). Der von p53 kodierte Transkriptionsfaktor reguliert die Induktion der Apoptose von Zellen, deren DNA irreparabel geschädigt ist oder führt zu einem Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase, damit beschädigte DNA vor der Replikation repariert

werden kann (VOGELSTEIN & KINZLER, 1992; HARRIS, 1996; PELLEGATA et al., 1996). Das Fehlen dieses Regulationsmechanismus kann zur malignen Transformation der Zellen führen (LEVINE et al., 1991). Mittlerweile wird postuliert, dass es für die Rezidivierung vor allem entscheidend ist, ob p53 vom Zytoplasma oder vom Zellkern exprimiert wird, da Tumoren mit nukleärer Expression wesentlich später rezidivieren, als solche, bei denen p53 im Zytoplasma nachgewiesen wird (HERSHEY et al., 2005). Auch das Fehlen der Heterozygotie in *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des p53 in somatischen Zellen hat sowohl auf die rezidivfreie Zeit als auch auf die Gesamtüberlebenszeit einen negativen Einfluss (BANERJI & KANJILAL, 2006). BANERJI und Mitarbeiter fanden ein Jahr später auch Hinweise auf eine genetische Prädisposition für FISS, da sie in Keimbahnen von Katzen SNPs fanden, die mit dem Auftreten der Neoplasien signifikant korrelierten (BANERJI et al., 2007). Ob jedoch tatsächlich eine Korrelation zwischen SNPs und dem Auftreten vorliegt, stellt eine spätere Studie wieder in Frage. Hier wurden die Polymorphismen sowohl bei Katzen mit FISS als auch in der Kontrollgruppe in gleicher Häufigkeit nachgewiesen (MUCHA et al., 2014).

Chromosomale Veränderungen wie Hyperploidien, Deletionen und Insertionen in FISS wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben (KALAT et al., 1991; MAYR et al., 1991; MAYR et al., 1994; MAYR et al., 1996; THOMAS et al., 2009). Der Verdacht, es könnte auch ein viraler Einfluss auf die Pathogenese durch Erreger wie das FeLV, das feline Immundefizienzvirus (FIV), das feline Foamyvirus, das feline Polyomavirus, das feline Papillomavirus oder das feline Oncornavirus vorliegen, wurden widerlegt (ELLIS et al., 1996; KIDNEY et al., 2000, 2001a; KIDNEY et al., 2001b; KIDNEY et al., 2001c; KIDNEY et al., 2002).

Die Wundheilung und die Bildung von Granulationsgewebe werden entscheidend von Wachstumsfaktoren beeinflusst. Doch es wurde auch nachgewiesen, dass Wachstumsfaktoren über diese Stimulation der Proliferation hinaus auch zur malignen Entartung führen können und die Angiogenese regulieren (ROSENTHAL et al., 1986; PEROSIO & BROOKS, 1989; KANDEL et al., 1991; GALY et al., 1999). In der Humanmedizin sind bereits zahlreiche Tumoren bekannt, die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aufweisen (HENDRICK, 1999).

Die Expression bestimmter Faktoren kann sogar von prognostischem Wert sein (DAVE et al., 2011). Mitte der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zeigten DAMBACH und Mitarbeiter, dass FISS den *epidermal growth factor* (EGF), den *fibroblast growth factor* (FGF), den *platelet-derived growth factor* (PDGF) und den *transforming growth factor- β* (TNF- β), sowie ihre jeweiligen Rezeptoren (EGFR, FGFR, PDGFR, TNF- β R) wesentlich stärker exprimieren als Sarkome, die nicht mit Injektionen assoziiert sind. Zusätzlich wiesen die Lymphozyten in Impfreaktionen (Entzündungen, aber auch Neoplasien) eine starke Expression des PDGF auf, wohingegen nicht-impf-assoziierte Entzündungen und Lymphozyten eines physiologischen Lymphknotens im Test negativ reagierten (DAMBACH et al., 1996). In der gleichen Studie erkannten die Autoren auch eine Überexpression des Protoonkogens *c-jun*, das zusammen mit *c-fos* den Transkriptionsfaktor AP-1 kodiert. Bei einem mitotischen Stimulus auf ruhende Fibroblasten in vitro wird dieses Protein als erstes exprimiert und führt zur Zellproliferation (DAMBACH et al., 1996). Sowohl in vitro als auch in vivo konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von *c-jun* und der Onkogenese nachgewiesen werden (SZABO et al., 1996). In einer weiteren Untersuchung konnten KATAYAMA und Mitarbeiter feststellen, dass PDGFR- β das Zellwachstum in FISS fördert und die Tumorzellen vor Apoptose schützt (KATAYAMA et al., 2004). NIETO und Mitarbeiter erbrachten 2003 den Nachweis, dass Fibrosarkome auch den FGF-b sowie den *transforming growth factor- α* (TGF- α) exprimieren. Wobei ersterer in der Immunhistochemie im Zytoplasma der Tumorzellen, doch auch in multinukleären Riesenzellen eine stark positive Reaktion zeigte (NIETO et al., 2003), was die Malignität dieser Zellpopulation in FISS hervorhebt (COUTO et al., 2002). FGF-b wird durch Stimulation proinflammatorischer Zytokine vermehrt ausgeschüttet und ist sowohl in die Angiogenese als auch in Entzündungsprozesse involviert, er ist des Weiteren an der Kanzerogenese beteiligt (GOSPODAROWICZ, 1987; SCHUH et al., 1990; KANDEL et al., 1991; LOGAN et al., 1991; BASILICO & MOSCATELLI, 1992; BIKFALVI et al., 1997; ORTEGA et al., 1998; SAMANIEGO et al., 1998; GALY et al., 1999). Der zur Familie des *epidermal growth factor* (EGF) gehörende Wachstumsfaktor TNF- α wirkt in Sarkomen stark mitogen (GERHARZ et al., 2000; NORMANNO et al., 2001; NIETO et al., 2003).

Mutationen des Protoonkogens c-Kit wurden bereits in mehreren humanen sowie caninen Neoplasien wie der systemischen Mastozytose (GOTLIB, 2006), der akuten myeloischen Leukämie (ADVANI, 2005), *gastrointestinal stromal tumors* (GIST) (LASOTA & MIETTINEN, 2006; SIDDIQUI & SCOTT, 2007) und caninen Mastzelltumoren (LONDON et al., 1999; ZEMKE et al., 2001; DOWNING et al., 2002) nachgewiesen. Auch das feline Sarkomvirus (FeSV) exprimiert das virale Onkogen v-Kit, das zur neoplastischen Transformation von Fibroblasten infizierter Katzen führt (BESMER et al., 1986; MAJUMDER et al., 1990; HERBST et al., 1995). Daher stellten SMITH und Mitarbeiter 2009 die Hypothese auf, dass c-Kit Einfluss auf die Entstehung aller feline Fibrosarkome hat, unabhängig welcher Genese. Zwar konnte in 9 % der 46 untersuchten histologischen Proben eine starke und in 17 % eine schwache Immunreaktivität für c-Kit nachgewiesen werden, doch es konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression des Protoonkogens, dem histologischen Grad und der Überlebenszeit dargestellt werden (SMITH et al., 2009).

Der Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) wurde ebenfalls in einer Mehrzahl von FISS nachgewiesen (PETTERINO et al., 2006). Verschiedene Zytokine, wie Interleukine, EGF, der PDGF, das Wachstumshormon (*growth hormone*-GH), der *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) und der *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) können zur Aktivierung des STAT3 führen (PETTERINO et al., 2006). Es wird vermutet, dass seine Aktivierung häufig im Laufe der Onkogenese stattfindet (GARCIA et al., 1997). In einer Vielzahl primärer Tumoren sowie neoplastischer Zelllinien wird durch die Expression von STAT3 eine Apoptoseresistenz induziert (RAHAMAN et al., 2002; REAL et al., 2002; ZAMO et al., 2002). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen seiner Aktivierung und der Invasivität, der Metastasierung, aber auch der durch verschiedene Protoonkogene und Proteine mediierten Zelltransformation (BOWMAN et al., 2001; YOSHIDA et al., 2002; NORONHA et al., 2003; JOO et al., 2004; XIE et al., 2004). PETTERINO und Mitarbeiter zeigten, dass die STAT3-Expression in FISS sowohl mit dem histologischen Grad als auch mit der Malignität, im Speziellen der Mitoserate korreliert ist (PETTERINO et al., 2006).

1.2. Inzidenz

Angaben zur Inzidenz der FISS variieren, doch in einem Punkt sind sich alle Autoren einig, nämlich, dass das Verhältnis von FISS zu Sarkomen anderer Ätiologie ab 1987 nahezu schlagartig anstieg. Während 1989 noch 61,9 % aller feline Fibrosarkome nicht mit Impfungen assoziiert werden konnten und nur 33,3 % als impf-assoziiert angesehen wurden, so wurden 1994 78,8 % aller Fibrosarkome als FISS diagnostiziert und lediglich 18,2 % traten an anderen, nicht impf-assoziierten Lokalisationen auf (DODDY et al., 1996). Im gleichen Zeitraum stieg die Gesamtzahl der im *Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory* diagnostizierten Fibrosarkome von 0,54 auf 4,33 Fälle pro Jahr an (DODDY et al., 1996). Die Gesamtinzidenz belief sich in einer epidemiologischen Studie von 1993 auf 2 FISS pro 10 000 Katzen im Jahr 1991. Außerdem stellte sich eine Inzidenz von etwa einem FISS pro 10 000 FeLV- oder Tollwutimpfungen heraus (KASS et al., 1993). Mit Hilfe von Fragebögen, die an die Mitglieder der *American Association of Feline Practitioners* versandt wurden, ergab sich, ungeachtet einiger Limitationen bei der Studiendurchführung, für das Jahr 1992 eine Prävalenz von 3,6 FISS pro 10 000 Katzen (COYNE et al., 1997). GOBAR und KASS hingegen kamen in ihrer internetbasierten Inzidenzstudie auf lediglich 0,63 FISS pro 10 000 geimpfter Katzen, wobei von 35 diagnostizierten Sarkomen, nur 2 alle Einschlusskriterien erfüllten und somit 33 Tumoren nicht in der Berechnung berücksichtigt wurden, was die Aussagekraft dieser Zahl begrenzt (GOBAR & KASS, 2002). All diese Zahlen gelten ausschließlich für den nordamerikanischen Raum. MARTANO et al. vermuten allerdings, dass die Inzidenz in einigen europäischen Ländern höher sein könnte (MARTANO et al., 2011). Wobei diese These für das Vereinigte Königreich widerlegt werden konnte. Die Auswertung von DEAN et al. zeigte eine Inzidenz von FISS bei einer von 10 000 Katzen, die in britischen Tierarztpraxen oder –kliniken vorgestellt wurden (DEAN et al., 2013). Eine aktuelle Studie aus Polen beweist die Unterschiede zwischen auf Onkologie spezialisierten Praxen, wo die Inzidenz mit 85 FISS pro 10 000 Katzen lag und anderen tierärztlichen Einrichtungen, in denen lediglich 0,16 % betroffen waren (KLICZKOWSKA et al., 2015).

Das Risiko der Tumorentstehung steigt mit der Anzahl der Injektionen, die an der gleichen Stelle appliziert werden. Katzen, die eine einzige Impfung erhalten, haben ein 0,5 mal größeres Tumorrisiko als Tiere, die gar nicht geimpft werden,

bei 2 Injektionen steigt dieses Risiko um das 1,27fache und bei 3 oder mehr Impfungen liegt es bei 1,75 mal so hoch (KASS et al., 1993).

1.3. Klinisches Bild

Im Vergleich zu Sarkomen an Lokalisationen, an denen kein Zusammenhang mit Injektionen oder anderen Irritationen gestellt werden kann, verhalten sich FISS aggressiver. Sie neigen stärker zur Nekrose und haben eine höhere Rezidivrate. Außerdem sind betroffene Katzen zum Zeitpunkt der Erkrankung mit median 8 Jahren jünger als solche mit idiopathischen Sarkomen. Zusätzlich sind sie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung größer als Injektionsstellen-assoziierte Sarkome, (HENDRICK et al., 1994b; DODDY et al., 1996). Des Weiteren neigen sie eher zur Metastasierung (CRONIN et al., 1998; HERSHEY et al., 2000) und kommen im Gegensatz zu nicht-Injektionsstellen-assoziierten Sarkomen häufiger in der Subkutis als in der Dermis vor (DODDY et al., 1996). Eine Rasse- oder Geschlechtsprädisposition konnte bisher nicht nachgewiesen werden (HENDRICK et al., 1994b; DODDY et al., 1996). Die Latenzzeit zwischen Injektion und Tumorgenese ist individuell unterschiedlich und kann sich zwischen 4 Wochen und 10 Jahren bewegen (HENDRICK et al., 1992; BURTON & MASON, 1997; SEGUIN, 2002).

Entsprechend ihrer Pathogenese treten FISS an Lokalisationen auf, an denen häufig Medikamente subkutan oder auch intramuskulär appliziert werden. Allerdings wurden in einer neueren Studie gewisse Veränderungen der Prädisloktionsstellen deutlich. Nach wie vor ist die Interskapularregion die häufigste Lokalisation von FISS. Doch während sie bis 1996 auch oft an der lateralen bis dorsolateralen Thoraxwand, der Lumbalregion sowie den Musculi semitendinosi und semimembranosi diagnostiziert wurden (HENDRICK et al., 1994b; DODDY et al., 1996), treten sie nun gehäuft auch an den distalen Gliedmaßen auf. Auch der Anteil der Sarkome an der lateralen Abdomenwand ist in den vergangenen Jahren gestiegen (SHAW et al., 2009). Dies ist zum einen auf die Änderungen der Zulassungen der Impfstoffe zurückzuführen, aber zum anderen auch auf die Empfehlungen der 1996 gegründeten *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force*, die rät, Injektionen möglichst weit distal an den Gliedmaßen zu applizieren und Impfungen an dafür allgemein festgelegten Lokalisationen zu verabreichen (MORRISON & STARR, 2001). Allerdings

wurde diese Studie in den USA durchgeführt, bisher wurden keine vergleichbaren Untersuchungen im europäischen Raum durchgeführt.

Makroskopisch präsentieren sich FISS als grauweiße, oft sehr derbe Umfangsvermehrungen in der Unterhaut oder Muskulatur. Sie scheinen palpatorisch gut abgegrenzt, fast wie abgekapselt, doch histologisch ist zu erkennen, dass sie strangartig entlang der Faszien-schichten des Rumpfes infiltrieren. Im Laufe der Tumorprogression können auch knöcherne Strukturen involviert werden (HENDRICK & BROOKS, 1994; DODDY et al., 1996; HENDRICK, 1999; HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Gerade größere Tumoren weisen oft zentrale Nekrosen auf, wodurch sie eher zystisch anmuten. Ihre Kavernen sind dann in der Regel mit visköser bis wässriger, bräunlicher Flüssigkeit gefüllt (GIUDICE et al., 2010).

1.4. Histologisches Bild

In den meisten Fällen handelt es sich bei FISS um Fibrosarkome (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; ESPLIN et al., 1993; KASS et al., 1993; HENDRICK et al., 1994a), aber auch maligne fibröse Histiozytome, Osteosarkome (ESPLIN et al., 1993; HENDRICK & BROOKS, 1994), myofibroblastische Sarkome (DUBIELZIG et al., 1993), Chondrosarkome (HENDRICK & BROOKS, 1994) sowie Rhabdomyosarkome (HENDRICK & BROOKS, 1994) wurden beschrieben. Sie weisen histologisch charakteristische Merkmale auf, die sie auch von idiopathischen Sarkomen unterscheiden (MADEWELL et al., 2001). Es finden sich vorwiegend Spindelzellen, multinukleäre Riesenzellen sowie einige wenige bis zahlreiche histiozytenähnliche Zellen. Auch Anisozytose und Anisokaryose prägen häufig das histologische Bild eines FISS (HENDRICK & BROOKS, 1994; MADEWELL et al., 2001). Nahezu alle von HENDRICK und BROOKS untersuchten FISS zeigten, wie es für mesenchymale Zellen typisch ist, eine positive Reaktion auf den immunhistochemischen Marker Vimentin. Zusätzlich reagierten einige der Formalin-fixierten Proben positiv auf einen oder mehrere Muskelmarker, wie Desmin, *muscle-specific actin* oder *smooth muscle actin*, was für das Vorliegen von Myofibroblasten in diesen Tumoren spricht (HENDRICK & BROOKS, 1994). COUTO und Mitarbeiter erkannten 2002, dass Myofibroblasten eine Pseudokapsel bilden können (COUTO et al., 2002). In der Peripherie der Tumoren findet sich meist eine Entzündungszone, die vorwiegend

aus Lymphozyten, aber auch Makrophagen besteht. Diese Makrophagen beinhalten oft Aluminiumpartikel, doch in Einzelfällen werden auch spindelige Tumorzellen darin gefunden (DODDY et al., 1996; MADEWELL et al., 2001). Außerdem werden FISS oft von Neutrophilen, Plasmazellen und Mastzellen infiltriert (MADEWELL et al., 2001). Weitere Charakteristika sind das Granulationsgewebe in der Tumorperipherie, lokale Infiltration, vaskuläre Invasion, eine hohe Mitoserate, sowie eine unregelmäßige Organisationsstruktur der Spindelzellen und der extrazellulären Matrix (DODDY et al., 1996). Auch perivaskuläre Lymphozyten- und Makrophagenaggregate sind in FISS vorhanden (HENDRICK, 1999), wobei erstere vorwiegend aus T-Lymphozyten bestehen. Es wird vermutet, dass die myofibroblastische Pseudokapsel die Infiltration des Tumorgewebes verhindert. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine solche Formationsbildung lediglich von B-Lymphozyten bekannt (COUTO et al., 2002).

1.5. Metastasierungsverhalten

Die Metastasierungsrate der FISS wird mit null bis 28 % angegeben (HERSHEY et al., 2000; BREGAZZI et al., 2001). Aufgrund ihres generell aggressiveren biologischen Verhaltens neigen sie jedoch eher zur Metastasierung als andere Weichteilsarkome (LADLOW, 2013). Da es vor allem zur hämatogenen Streuung der Tumorzellen kommt, ist die Lunge die primäre Prädispositionsstelle der Metastasierung, doch auch regionäre Lymphknoten (KOBAYASHI et al., 2002; ROMANELLI et al., 2008), der Epiduralraum (CHANG et al., 2006), Knochen (HAHN et al., 2007), Nieren, Milz, Darm sowie Haut (KOBAYASHI et al., 2002) können betroffen sein. Darüber hinaus können auch Leber, Pankreas, Omentum majus, Mediastinum, Perikard und Auge befallen werden (FULTON et al., 1991; ESPLIN & CAMPBELL, 1995; ESPLIN et al., 1996; RUDMANN et al., 1996; SANDLER et al., 1997). Mit der Anzahl der Rezidive und der Operationen steigt auch die Metastasierungsrate des Tumors (HERSHEY et al., 2000).

1.6. Diagnostisches Vorgehen

Häufig liegt der Verdacht auf ein FISS schon aufgrund der Anamnese und der klinischen Präsentation nahe. Daher sollte im Vorbericht auch besondere Aufmerksamkeit auf bisherige Impfungen oder Injektionen und den Verlauf der Krankheit gerichtet werden. Die 1996 gegründete *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force* empfiehlt Umfangsvermehrungen, die entweder 3 Monate

nach der letzten Injektionen immer noch bestehen, die größer sind als 2 Zentimeter oder einen Monat nach Injektion immer noch wachsen, auf jeden Fall zu untersuchen (FORCE, 1999). Eine zytologische Untersuchung von Feinnadelaspiraten ist in nur circa 50 % der Fälle diagnostisch (FORCE, 1999), sollte jedoch immer als erstes durchgeführt werden, da sie Hinweise auf die Histogenese geben kann und den Ausschluss verschiedener Differentialdiagnosen ermöglicht (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). Oft kann zytologisch die Diagnose eines mesenchymalen Tumors gestellt werden, doch in vielen anderen Fällen werden einzig Entzündungszellen in den Aspiraten gefunden, was das Vorliegen eines Fibrosarkoms allerdings keinesfalls ausschließt (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Zur Bestätigung des klinischen und zytologischen Verdachts sollten daher Biopsieproben zur histopathologischen Untersuchung entnommen werden. Wie bereits vorher erwähnt sind die Tumoren oft zentral nekrotisch und mit visköser Flüssigkeit gefüllt. Bei der Probenentnahme sollte daher darauf geachtet werden, dass möglichst vitales Tumorgewebe gewonnen wird. Außerdem sollte die Lokalisation so gewählt werden, dass die Biopsienarbe bei einer späteren Operation problemlos mit entfernt werden kann (MARTANO et al., 2011). Da die erste chirurgische Exstirpation eines FISS entscheidend für die Prognose ist, sollte die inzisionale Biopsie immer der exzisionalen vorgezogen werden (FORCE, 1999, 2005).

Neben einer ausführlichen klinischen Untersuchung sollte in jedem Fall ein Blutbild mit Differentialblutbild, ein Serumprofil und eine Urinanalyse durchgeführt werden, um den allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten zu evaluieren. Zusätzlich sollte die Katze auf FeLV, sowie FIV getestet werden (MARTANO et al., 2011), da eine Infektion mit einem der beiden Erreger auch Einfluss auf den klinischen Verlauf der Erkrankung haben könnte (MCENTEE & PAGE, 2001). Eine spezielle Untersuchung des Tumors mit eingehender Palpation und genauer Bestimmung seiner Lokalisation ist ebenfalls unabdingbar. Mithilfe von Röntgenaufnahmen des Thorax in mindestens 3 Ebenen sowie einer ultrasonographischen Untersuchung des Abdomens sollte eine mögliche Metastasierung des Tumors abgeklärt werden. Zu diesem Zweck sollten auch regionale Lymphknoten sorgfältig palpiert und gegebenenfalls punktiert und zytologisch untersucht werden. Es empfiehlt sich auch die Ausdehnung der

Umfangsvermehrung mithilfe einer Computertomographie (CT) genauer zu untersuchen, da sich heraus gestellt hat, dass Tumoren, die mit diesem bildgebenden Verfahren vermessen wurden, doppelt so groß waren als in der vorangegangenen klinischen Untersuchung dokumentiert (MCENTEE, 2000). Auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) kann bei der Planung einer Operation helfen, um die Ausdehnung der infiltrativ wachsenden Umfangsvermehrung besser einschätzen zu können (MARTANO et al., 2011). Es muss allerdings beachtet werden, dass das Tumolvolumen in diesen Schnittbildverfahren durch die entzündlichen Veränderungen überbewertet werden kann (LADLOW, 2013).

1.7. Therapie

Eine wirklich kurative Therapie für FISS gibt es bisher noch nicht. Die wichtigste Maßnahme bleibt nach wie vor die weiträumige chirurgische Exzision der Umfangsvermehrungen. Doch mittlerweile ist bekannt, dass sich eine multimodale Therapie positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt. Im Folgenden sollen Therapieformen, die bereits auf ihren Erfolg beim FISS untersucht wurden, genauer ausgeführt werden.

1.7.1. Chirurgie

Die chirurgische Entfernung des FISS ist die am häufigsten durchgeführte Therapieform und auch die mit den besten Erfolgschancen (MCENTEE & PAGE, 2001). Dabei wird empfohlen den Tumor lateral 3 bis 5 Zentimeter im makroskopisch gesunden Gewebe zu umschneiden und in der Tiefe 2 Muskelschichten oder Knochen zu entfernen (LADLOW, 2013). Außerdem sollte bei Bedarf auch eine partielle Skapulektomie, gegebenenfalls auch eine Amputation mit Skapulektomie oder wenn nötig auch Hemipelvektomie sowie eine Osteotomie der Processi spinosi durchgeführt werden (HERSHEY et al., 2000; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002; SEGUIN, 2002; DAVIS et al., 2007; ROMANELLI et al., 2008; LADLOW, 2013). Die Erfolgsraten dieser Studien sind teilweise ernüchternd und Angaben zur Rezidivrate variieren zwischen 14 % und 89 % (MARTANO et al., 2005; BANERJI & KANJILAL, 2006; GIUDICE et al., 2010; PHELPS et al., 2011). In der Studie von HERSHEY et al. entwickelten fast 90 % der Tiere einen erneuten Tumor innerhalb eines Jahres *post operationem* (HERSHEY et al., 2000). Dabei ist die vollständige

Resektion des Sarkoms entscheidend, wie eine Studie zum Krankheitsverlauf von Katzen nach alleiniger Operation herausfand. Hier lag die mediane rezidivfreie Zeit der Gesamtpopulation bei 10 Monaten, wobei sich diese Zeitspanne mit der Anzahl der vorangegangenen Operationen verkürzte. So blieben Katzen, die bisher nur einer chirurgischen Tumorentfernung unterzogen worden waren, median 16 Monate rezidivfrei, wohingegen sich diese Zeit bei Tieren, die bereits mindestens zweimal operiert worden waren, auf nur median 5 Monate verkürzte (DAVIDSON et al., 1997). Noch enttäuschender sind die von HERSHEY und Mitarbeitern veröffentlichten Zahlen. In ihrer retrospektiven Untersuchung von 61 Katzen, deren FISS ausschließlich operativ versorgt worden war, blieben die Tiere lediglich median 94 Tage rezidivfrei. Wobei sich hier ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Operateur zeigte, denn mit median 66 Tagen war die Remissionszeit von Katzen, die von einem praktischen Tierarzt operiert worden waren, wesentlich kürzer als bei Tieren, deren FISS von einem erfahrenen Chirurgen in einer Überweisungsklinik exstirpiert worden war. Letztere entwickelten erst nach median 274 Tagen ein Rezidiv. Auch ob der Tumor in der ersten Operation nur marginal (unter 3 Zentimetern im Gesunden) oder weiträumig (in dieser Studie definiert als Tumorränder größer/gleich 3 Zentimetern im Gesunden) entfernt wurde, machte mit 66 Tagen versus 419 Tagen einen signifikanten Unterschied in der rezidivfreien Zeit aus. Außerdem verkürzte sich diese Zeit bis zur erneuten Tumorentstehung mit jedem Rezidiv und jeder weiteren Operation (HERSHEY et al., 2000). DAVIDSON und Kollegen konnten den großen Unterschied zwischen kompletter und unvollständiger Exzision aufzeigen. Katzen, deren Tumoren histologisch im Gesunden entfernt worden waren, blieben median mehr als 16 Monate rezidivfrei, wohin gegen die Katzen mit inkompletter Resektion im Medianen bereits nach 4 Monaten wieder FISS entwickelten (DAVIDSON et al., 1997). PHELPS et al. evaluierten 2011 Therapieerfolg und Komplikationsrisiken der radikalen Operationen. Jegliche anatomische Struktur, wie Thorax- oder Abdomenwand, Processus spinosi dorsales, Ala ossis ilii oder Skapula, die in diese festgelegten Abstände fiel, wurde ebenfalls entfernt. Mit einer Rezidivrate von 14 % erzielte diese Operationsmethode wesentlich bessere Ergebnisse. Bei 11 % der Katzen kam es zu schwerwiegenden Komplikationen, die jedoch alle nicht tödlich verliefen. Auch dies, so die Autoren, sei in Anbetracht des wirklich schwerwiegenden Eingriffs vertretbar (PHELPS et al., 2011). Ähnlich radikale

Operationsmethoden führen zu vergleichbaren Erfolgen. So entfernten KUNTZ und POWERS 19 Katzen ihr FISS mit einem Abstand von 5 Zentimetern im Gesunden und resezierten zusätzlich mindestens 2 darunter liegende Muskelschichten. Keine der Katzen entwickelte bis zum Abschluss der Studie, einem Zeitraum von 433 Tagen, ein Rezidiv (KUNTZ & POWERS, 2000). Keine der 6 Katzen, die LIDBETTER und Mitarbeiter in ihrer Studie einer lateralen Körperwandresektion unterzogen, zeigte innerhalb des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich 17 Monaten ein Rezidiv. Es sollte jedoch beachtet werden, dass 3 der 6 Katzen präoperativ bestrahlt wurden, was auch einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte (LIDBETTER et al., 2002). Die Autoren planten den umfangreichen Eingriff anhand von CT-Bildern und hielten einen Sicherheitsabstand von mindestens 3 Zentimetern ein, wodurch sie alle Tumoren auch mikroskopisch komplett im Gesunden exstirpierten. Die Hälfte der Katzen entwickelte hierbei Komplikationen, bei 2 wird von geringgradigen Nahtdehiszenzen berichtet, ein Tier musste *post operationem* reanimiert werden (LIDBETTER et al., 2002).

Die komplette chirurgische Entfernung der FISS mit Tumorzell-freien Operationsrändern ist von prädiktivem Wert. GUIDICE und Mitarbeiter untersuchten 2010 48 Fälle und fanden heraus, dass Tumoren mit infiltrierte Rändern zehnmal häufiger wiederkehren als Exstirpate mit sauberen Rändern, wobei es auch bei letztgenannten in 19 % der Fälle zum Rezidiv kam (GIUDICE et al., 2010). Außerdem hat auch die Größe des Tumors zum Zeitpunkt seiner Entfernung einen Einfluss auf die Prognose. Katzen mit Tumoren, die kleiner als 2 Zentimeter im Durchmesser sind, haben eine signifikant längere mediane Überlebenszeit als Katzen, deren Tumoren diese Größe schon überschritten haben (DILLON et al., 2005).

1.7.2. Radiotherapie

Es wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht, in denen die Kombination aus weiträumiger chirurgischer Exzision und vorheriger oder anschließender Radiotherapie evaluiert wurden. Die Autoren kamen letztendlich alle zu den gleichen Ergebnissen. Die Rezidivraten lagen zwischen 41 und 45 %, die Metastasierungsraten bei 12 bis 21 % (CRONIN et al., 1998; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002; ECKSTEIN et al., 2009; MAYER et al., 2009). Die

Meinungen dazu, wann die Radiotherapie durchgeführt werden soll, variieren, denn sowohl neoadjuvante als auch adjuvante Bestrahlung haben Vor- und Nachteile.

Die präoperative Radiotherapie hat zum einen den größeren Antitumor-Effekt, da die Mehrzahl der Zellen durch die noch unbeeinträchtigte Blutversorgung nicht hypoxisch und somit noch nicht resistent gegen die Sauerstoffradikale-produzierende Therapie sind. Zum anderen kann die Größenreduktion des Tumors eine chirurgische Exzision erleichtern und das Risiko der Dissemination neoplastischer Zellen während der Operation minimieren. Ein erhöhtes Risiko für postoperative Komplikationen, vor allem in Form von Nahtdehiszenzen ist ein Nachteil der neoadjuvanten Radiotherapie (MCLEOD & THRALL, 1989). In 2 Studien, in denen die präoperative Bestrahlung mit Kobalt⁶⁰ untersucht wurde, berichten die Autoren von Lokalrezidiven bei 40 bis 45 % der Katzen median 398 bis 584 Tage nach chirurgischer Entfernung. In beiden Studien verlängerte eine komplette Resektion die mediane krankheitsfreie Zeit signifikant. Mit 700 bis 986 Tagen war dieses Intervall bei komplett entfernten Tumoren deutlich länger als mit 112 bis 292 Tagen bei unvollständig resezierten Tumoren (CRONIN et al., 1998; KOBAYASHI et al., 2002).

Die adjuvante Radiotherapie bietet den Vorteil, dass die operative Entfernung des Sarkoms nicht länger hinausgezögert wird und, dass die Bestrahlung mikroskopischer Tumorreste effektiver ist als eine Strahlentherapie großer Umfangsvermehrungen (MCLEOD & THRALL, 1989). Allerdings muss bei dieser Vorgehensweise das Bestrahlungsfeld wesentlich größer geplant werden und durch die verminderte Durchblutung steigt die Anzahl der hypoxischen und somit strahlenresistenten Zellen. Außerdem gibt die Zeit der Wundheilung, für die in der Regel eine Pause zwischen beiden Behandlungen eingeplant wird, den Tumorzellen die Möglichkeit sich wieder zu vermehren (MCLEOD & THRALL, 1989; COHEN et al., 2001). Je früher die adjuvante Radiotherapie nach der Operation aufgenommen wird, desto länger ist sowohl die krankheitsfreie Zeit als auch die Gesamtüberlebenszeit (COHEN et al., 2001). Im Gegensatz dazu fanden DEMETRIOU et al. heraus, dass eine Verzögerung des Beginns der Radiotherapie nach marginaler Exzision von Weichteilsarkomen bei Hunden zu einer Reduktion der Rezidivrate führt (DEMETRIOU et al., 2012). Der Therapieerfolg, der mit

postoperativer Bestrahlung erreicht wird, entspricht dem der präoperativen Radiotherapie. In einer Studie, in der 78 Fälle retrospektiv untersucht wurden, entwickelten 41 % der Tiere, die adjuvant bestrahlt worden waren nach median 405 Tagen ein Rezidiv. Dabei war das Vorliegen eines Primärtumors von günstigem prognostischem Wert. Wohingegen die Tumorgroße zum Zeitpunkt der ersten Operation, sowie eine Metastasierung die Gesamtüberlebenszeit negativ beeinflussten. Die rezidivfreie Zeit veränderte sich weder durch eine zytostatische Therapie noch durch eine Tumorexzision im Gesunden (COHEN et al., 2001). Von den 42 Katzen, die in der Studie von HAHN et al. *post operationem* bestrahlt wurden, entwickelten 59 % erneut einen Tumor und blieben lediglich median 6 Monate rezidivfrei. Allerdings waren die Tumoren dieser Kohorte alle unvollständig chirurgisch entfernt worden (HAHN et al., 2007). Eine andere retrospektive Studie zu prognostischen Faktoren in Bezug auf die Behandlung von FISS untersuchte insgesamt 76 Katzen, von denen 46 Tiere postoperativ mit einem kurativen Bestrahlungsprotokoll behandelt und 27 Katzen stark fraktioniert bestrahlt wurden. Die Tiere der ersten Gruppe, deren Tumoren fast alle im Gesunden entfernt worden waren, blieben median 37 Monate rezidivfrei und ihre mediane Überlebenszeit lag bei 42 Monaten. In dem zweiten Patientenkollektiv, das vorwiegend Katzen mit mikroskopischer oder makroskopischer Tumorbürde beinhaltete, traten nach median 10 Monaten Rezidive auf und die Katzen lebten median 24 Monate. Für diese Gruppe waren eine adjuvante Chemotherapie bei großen Tumoren und eine möglichst geringe Anzahl an Operationen vor der Bestrahlung von positivem prognostischem Wert. Außerdem hatten Katzen mit mikroskopischen Tumorresten ein besseres *outcome* als solche mit sichtbaren Umfangsvermehrungen (ECKSTEIN et al., 2009).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung mediane Überlebenszeiten von 600 bis 842 Tagen erreicht werden und nach einem, 2 und 3 Jahren sind noch 86 %, 44 % beziehungsweise 28 % der Tiere am Leben (CRONIN et al., 1998; BREGAZZI et al., 2001; COHEN et al., 2001). Doch in einer Studie, die 2009 prä- und postoperative Radiotherapie verglich, zeigte sich die adjuvante Bestrahlung mit einer medianen Überlebenszeit der Katzen von 705 Tagen als effektiver als die neoadjuvante Strahlentherapie, die zu einer medianen Überlebenszeit von 310 Tagen führte (MAYER et al., 2009).

Ein neuerer Therapieansatz wurde von NOLAN et al. beschrieben. Sie werteten retrospektiv die stereotaktische Bestrahlung bei 11 Katzen mit makroskopischen Tumoren aus und zeigten, dass eine mediane Überlebenszeit von 301 Tagen erzielt werden konnte. Bei 8 der 11 Katzen führte die Therapie zu einer kompletten oder partiellen Remission. Median 242 Tage nach dieser Radiotherapie kam es zur Tumorprogression. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass sich dieser Therapieansatz besser zur Kombination mit chirurgischer Exzision oder als palliative Maßnahme eignet (NOLAN et al., 2013).

1.7.3. Zytostatische Therapie und Elektrochemotherapie

Die Bedeutung der Chemotherapie in der Behandlung von FISS wurde bereits in mehreren Studien und mit unterschiedlichen Medikamenten evaluiert. Allerdings gelten FISS generell eher als chemoresistent, so dass sich der therapeutische Effekt selten voraussagen lässt (COUTO & MACY, 1998). Eine *in vitro*-Sensitivität konnte bei FISS-Zelllinien gegenüber Doxorubicin, Mitoxantron, Vincristin und Paclitaxel nachgewiesen werden (WILLIAMS et al., 2001; BANERJI et al., 2002).

In einer neueren Studie wurde die fehlende Wirkung des Antitumorantibiotikums Doxorubicin auf das zelluläre Proteasom des FISS nachgewiesen, was das mangelhafte Ansprechen der Neoplasien auf dieses Medikament möglicherweise erklären könnte (CERRUTI et al., 2010).

Teilweise vielversprechende Ergebnisse früherer, retrospektiver Studien ohne Kontrollgruppen mit 661 Tagen rezidivfreier Zeit und in einzelnen Fällen sogar kompletter Remissionen (BARBER et al., 2000; BREGAZZI et al., 2001) konnten von HAHN und Mitarbeitern nicht bestätigt werden. Sie evaluierten 71 Fälle von inkomplett resezierten FISS, die unterschiedlich behandelt wurden. Die 29 Katzen, die zusätzlich zur postoperativen Bestrahlung mit Doxorubicin therapiert wurden, blieben signifikant länger krankheitsfrei als die 42, die nur bestrahlt wurden. Der Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit war wiederum statistisch nicht signifikant, wobei die Katzen, die nur bestrahlt und operiert worden waren, median 29,4 Monate überlebten, die Patienten der Doxorubicin-Gruppe waren hingegen nach median 16,3 Monaten verstorben (HAHN et al., 2007).

Vielversprechende Ergebnisse zeigt die Kombination aus neoadjuvanter und

adjuvanter Chemotherapie mit Epirubicin und radikaler Resektion. BRAY und POLTON erreichten mit diesem Therapieansatz eine mittlere Überlebenszeit von 2014 Tagen. Die mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da 80 % der Tiere nach Abschluss der Studie noch am Leben waren. Zudem berichten die Autoren von guter Tolerabilität. Fünf Katzen entwickelten Anorexie im Zuge der Chemotherapie und bei zweien kam es zu Nahtdehiszenzen innerhalb der ersten 2 Wochen *post operationem*. Wobei die Autoren betonen, dass sich ihre Operationsmethode auch von anderen bisherigen Studien unterscheidet. Sie verwendeten Schnittbildverfahren zur Planung der Exzision (BRAY & POLTON, 2014).

Eine große Multicenter-Studie verglich 2002 die Wirksamkeit von Doxorubicin und Liposomen-ummanteltem Doxorubicin bei 108 Katzen mit FISS. Insgesamt konnte bei 39 % der Tiere mit inoperablen Tumoren ein Ansprechen beobachtet werden, bei weiteren 39 % der Patienten stagnierte das Tumorwachstum. Dabei konnte kein statistischer Unterschied in der Wirkung der beiden Agenzien festgestellt werden. Doch auch hier war der Therapieerfolg nicht von langer Dauer, denn bereits nach 84 Tagen zeigten die Umfangsvermehrungen wieder ein progressives Wachstum. Auch 44 % der postoperativ mit einem der Medikamente behandelten Tiere entwickelten Lokalrezidive, bei weiteren 4 Katzen (5 %) bildeten sich Metastasen. Auch in dieser Gruppe der Tiere mit mikroskopischer Tumorbürde konnte kein Unterschied in der Effektivität zwischen Doxorubicin und der Liposomen-ummantelten Formulierung des Medikaments eruiert werden. Die 108 Katzen lebten median 388 Tage krankheitsfrei, was eine statistisch signifikant längere Zeit ist als die 93 Tage der historischen Kontrollgruppe. Ein wesentlicher prognostischer Faktor in Bezug auf die Überlebenszeit stellte die komplette chirurgische Exzision dar. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass liposomen-ummanteltes Doxorubicin keine Vorteile gegenüber dem herkömmlichen Doxorubicin bringt, da sich in der Effektivität kein Unterschied zeigt, die Formulierung aber zum einen kostenintensiver ist und zum anderen ein größeres Nebenwirkungsrisiko birgt (POIRIER et al., 2002).

In einer neueren Studie zur Behandlung inoperabler feline Weichteilsarkome mit einer Kombination aus liposomalem Doxorubicin und täglicher palliativer Radiotherapie reagierten insgesamt 7 der 10 Patienten mit partieller beziehungsweise kompletter Remission, die median 237 Tage anhielt. Bei 2

Katzen blieb der Tumor für 40 beziehungsweise 48 Tage stabil in seiner Größe, ein Tier zeigte unmittelbar nach Therapiebeginn ein progressives Tumorwachstum. Insgesamt überlebten die Katzen in dieser Studie median 324 Tage, wobei 2 der Tiere bei Abschluss der Datenanalyse noch am Leben waren. Akute Nebenwirkungen traten lediglich bei 2 der Katzen in Form von Anorexie, Erbrechen, Gewichtsverlust und trockener Desquamation im Bestrahlungsfeld auf (KLEITER et al., 2010).

KOBAYASHI und Mitarbeiter kamen 2001 zu dem Schluss, dass zwar die Durchführung einer Chemotherapie ebenso wenig einen signifikanten Effekt auf die Zeitspanne bis zum ersten Ereignis (Rezidiv, Metastasierung, Tod) hat wie die Art der Chemotherapie, doch die Katzen, die Carboplatin als Monotherapie bekamen, waren mit über 986 Tagen am längsten krankheitsfrei (KOBAYASHI et al., 2002).

In einer Verträglichkeitsstudie mit Lomustin, in der unter anderem auch 5 Katzen mit makroskopischem FISS behandelt wurden, zeigten 2 Katzen eine partielle Remission. Allerdings war die mediane Remissionszeit mit 65 Tagen sehr kurz (FAN et al., 2002).

Nur geringgradig vielversprechender waren die Ergebnisse der Studie von RASSNICK et al., die 27 Katzen mit inoperablen FISS mit Ifosfamid behandelten. Eine komplette und 10 partielle Remissionen hielten median 70 Tage an. Allerdings mussten 3 Katzen aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen euthanasiert werden (RASSNICK et al., 2006).

Eine andere therapeutische Herangehensweise stellt die Elektrochemotherapie dar. Hierbei wird das Zytostatikum lokal appliziert und die Aufnahme des Medikaments in die Zellen durch biphasische elektrische Impulse erhöht (BELEHRADEK et al., 1993). Die elektrischen Stimuli machen die Zellmembran permeabel, so dass das Medikament direkt an seinen Wirkungsort, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gelangen kann. In einer Studie, in der 12 Katzen mit fortgeschrittenen FISS mit Bleomycin in Form von Elektrochemotherapie behandelt wurden, konnte eine Stagnation des Tumorwachstums für 2 Wochen bis 7 Monate erreicht werden. Die Gesamtüberlebenszeit der Kontrollgruppe belief sich auf median 24 Tage, während die Therapietiere mit median 6 Monaten signifikant länger lebten (MIR et al., 1997). SPUGNINI und Kollegen

therapierten in einer randomisierten Untersuchung 72 Katzen mit der gleichen Methode. Es entwickelten 63 % der Tiere mit makroskopischen Tumoren Rezidive nach median 12 Monaten, wobei lediglich die Tumorgöße für die Prognose von Bedeutung war. Von den 39 Katzen mit mikroskopischer Tumorbürde hatten 46 % nach median 19 Monaten ein Rezidiv. In dieser Kohorte blieben Katzen, die nicht vorbehandelt waren, signifikant länger tumorfrei als Katzen, die bereits einer Therapie unterzogen worden waren. Alle Katzen der Kontrollgruppe, deren Tumor nur chirurgisch entfernt wurde, entwickelten Rezidive, die nach median 4 Monaten auftraten (SPUGNINI et al., 2007). Die gleiche Arbeitsgruppe überprüfte dann auch die Effektivität und Verträglichkeit von Cisplatin in Kombination mit elektrischen Impulsen (SPUGNINI et al., 2011). Dieses Platinderivat darf Katzen aufgrund seiner Toxizität nicht systemisch verabreicht werden, da es zu tödlichen pulmonären Komplikationen führen kann (BARABAS et al., 2008). Die ausschließlich lokale Applikation des Zytostatikums führte lediglich zu milden gastrointestinalen Nebenwirkungen bei 3 Katzen. Die Rezidivrate der so therapierten Katzen lag bei 29 %, wobei die Remission 535 bis 797 Tage anhielt. Dahingegen entwickelten 13 von 14 Kontrolltieren nach median 180 Tagen ein Rezidiv (SPUGNINI et al., 2011).

1.7.4. Unspezifische Immuntherapie

Mit der unspezifischen Immuntherapie soll das angeborene Immunsystem, zu dem unter anderem Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen zählen, stimuliert werden, um gegen neoplastische Zellen aktiv zu werden. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene und versucht sie mithilfe von schneller lokaler Reaktion, wie einer Entzündung zu eliminieren.

Acemannan ist ein langkettiges, polydisperses Polymer des Kohlenhydrats Mannan, das aus der Aloe v-Vera-Pflanze gewonnen wird. Es wurde bereits in mehreren Studien auf seine Wirksamkeit in der Therapie des FISS untersucht. Erstmals testeten HARRIS und Mitarbeiter das Agens in einer Pilotstudie, in der sie 43 Hunde und Katzen mit unterschiedlichen Neoplasien Acemannan intraperitoneal (i.p.) und intraläsional (i.t.) applizierten. In die Analyse waren auch 7 Tiere mit Fibrosarkomen eingeschlossen, von denen 5 eine klinische Verbesserung in Form von Tumorverkleinerung, Tumornekrose oder verlängerter Überlebenszeit zeigten (HARRIS et al., 1991). In einer Fallserie zur unspezifischen Immunstimulation mit Acemannan berichtete KENT 1993 unter

anderem von 3 Katzen, denen das Mittel ebenfalls i.p. und i.t. verabreicht wurde. Eine Katze blieb rezidivfrei, die zweite entwickelte ein Lokalrezidiv und die dritte wurde aufgrund ihres Tumors euthanasiert. Die niedrige Fallzahl dieser Studie schränkt ihre Aussagekraft über die Wirkung von Acemannan ein (KENT, 1993). Zwei Jahre später analysierten KING und Kollegen die Wirkung von Acemannan in Kombination mit chirurgischer Exzision und Radiotherapie bei 5 Katzen und 8 Hunden mit rezidivierenden Fibrosarkomen. Nach mehrfacher i.p.- und i.t.-Applikation des Agens wurden die Tumoren von 12 Tieren kleiner. Außerdem konnten deutliche Entzündungsreaktionen und Nekrosen festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Datenanalyse waren 7 der 13 Studientiere noch am Leben und tumorfrei. Die mediane Überlebenszeit belief sich auf 372 Tage (KING et al., 1995).

Interferone sind in der Immuntherapie von Tumoren von Bedeutung. Diese Signalsubstanzen werden zum Beispiel bei Virusinfektionen von Leukozyten und Fibroblasten gebildet und hemmen generell die Proteinbiosynthese in Zellen, wodurch die Virusvermehrung eingedämmt wird (BAUER & WALZOG, 2003). HAMPEL und Kollegen setzten 2007 rekombinantes felines Interferon- ω (feIFN- ω) in einer unkontrollierten Studie bei 20 Katzen mit FISS ein. Dabei wurde den Tieren dieses Typ-1-Interferon *prae operationem* viermal i.t. und nach chirurgischer Entfernung des Tumors achtmal subkutan appliziert. Nach dieser adjuvanten Immunstimulation konnte in vitro eine Hochregulation von *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Molekülen in FISS-Zelllinien nachgewiesen werden. Mit einer Rezidivrate von 45 % und nur milden, selbstlimitierenden Nebenwirkung könnte auch das ein sinnvoller Therapieansatz sein. Allerdings war das mediane Tumolvolumen gering, so dass die Rezidivrate alleine keine Aussage über die Effektivität ermöglicht (HAMPEL et al., 2007).

1.7.5. Immunologische Genterapie

QUINTIN-COLONNA und Mitarbeiter waren 1996 Vorreiter für die gentherapeutische Immuntherapie des FISS. Sie transfizierten humanes Interleukin-2 (huIL-2) in xenogene Verozellen, die 16 Katzen nach Operation und Radiotherapie siebenmal peritumoral injiziert wurden. Der Therapieerfolg wurde mit einer zufällig ausgewählten Kontrollgruppe verglichen und erschien vielversprechend. Innerhalb der ersten 6 Monate trat unter den Therapietieren kein Rezidiv auf, während bereits 56 % der Kontrolltiere erneut einen Tumor

entwickelt hatten. Diese Rate stieg in den darauffolgenden 10 Monaten weiter auf 69 %, wohingegen nur 31 % der Therapiekohorte in dieser Zeit ein Rezidiv entwickelt hatten. Auftretende Nebenwirkungen waren überwiegend mild, allerdings führte die zweite Injektion der Vero-huIL-2-Zellen bei einer Katze zu einem anaphylaktischen Schock (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). JOURDIER und Mitarbeiter verglichen 2003 in ihrer Studie zur Immuntherapie mit viralem Gentransfer gleich 3 Gruppen: Eine Kontrollgruppe wurde nur operiert und postoperativ bestrahlt, der ersten Therapiegruppe wurde nach Operation und Radiotherapie ein attenuierter Vacciniavirus-Genvektor mit Expression von huIL-2 injiziert, die zweite Therapiegruppe erhielt einen Canarypoxvirus-Genvektor mit Expression von feline Interleukin-2 (feIL-2). Nach 12 Monaten war bei 61 % der Kontrolltiere ein Rezidiv zu verzeichnen, während nur 39 % der ersten und sogar nur 28 % der zweiten Immuntherapiegruppe wieder erkrankten (JOURDIER et al., 2003). Rekombinantes, felines Interleukin-2 exprimierendes Canarypoxvirus-Gen wurde auch von JAS et al. als adjuvante Immuntherapie in Verbindung mit Brachytherapie eingesetzt. Damit erreichten sie innerhalb von 2 Jahren nach der Therapie eine Reduktion des Rezidivrisikos um 65%. Die krankheitsfreie Zeit lag bei den Katzen, die lediglich operiert und bestrahlt worden waren bei 287 Tagen, wohingegen die Tiere der Immuntherapiegruppen über 730 Tage kein Rezidiv entwickelten (JAS et al., 2015).

In einer Phase-II-Studie von WALSCH wurden 34 Katzen mit FISS neoadjuvant mit einer Immunogen Therapie behandelt. Den Tieren wurde ein für felines *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (feGM-CSF) kodierendes Plasmid appliziert. Die Tiere wurden über 360 Tage post operationem beobachtet und der Erfolg wurde mit einer Kontrollgruppe, in der die Katzen ausschließlich chirurgisch behandelt worden waren, verglichen. Mit Rezidivraten von 41 % in der Therapiegruppe und 65 % im Kontrollkollektiv konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden, ließ aber tendenziell eine Effektivität vermuten (WALSCH, 2010). In einer prospektiven, randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie untersuchte man 2011 die Effektivität einer neoadjuvanten Immuntherapie mit den feline Zytokinen Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und GM-CSF mittels Magnetofektion (HAAS, 2011). Dosis und praktische Durchführung orientierten sich dabei an vorangegangenen Phase-I-

und -II-Studien zur Dosisfindung, Praktikabilität und Verträglichkeit dieser Therapie (JAHNKE et al., 2007; HUTTINGER et al., 2008; HOEKSMA, 2011). Den 25 Katzen der Therapiegruppe wurde das Medikament 14 und 7 Tage vor der operativen Entfernung i.t. appliziert. Nach der Injektion wurde ein Magnet für 60 Minuten auf dem Tumor fixiert, so dass die an Eisenpartikel adsorbierten Plasmide an die nächste Zellwand heran gepresst und von den Zellen aufgenommen wurden. Im Beobachtungszeitraum von 360 Tagen entwickelten 28 % der Therapietiere Rezidive und 12 % wiesen Metastasen auf. Unter den 25 Katzen, die als Kontrolltiere nur operiert worden waren, kam es bei 44 % zu Rezidiven und Metastasen wurden bei 24 % detektiert. Obwohl auch Katzen mit großen rezidierten Tumoren, die prognostisch sehr ungünstig sind, in die Studie eingeschlossen wurden, liegen für die Therapiegruppe sehr niedrige und letztendlich auch für die Kontrollgruppe beachtlich niedrige Rezidivraten vor (HAAS, 2011).

1.7.6. Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

Die molekulare Antitumorthérapie stellt eine relativ neue Form der Therapie in der Onkologie dar. Auf die verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) soll in einem späteren Kapitel dieser Arbeit noch ausführlicher eingegangen werden. Wie bereits in einem früheren Kapitel dieser Arbeit erwähnt, konnte bereits nachgewiesen werden, dass FISS PDGF, PDGFR, EGF und seinen Rezeptor, FGF- β , TGF- α und - β , sowie in geringerem Maße auch c-Kit exprimieren (HENDRICK, 1998, 1999; NIETO et al., 2003; SMITH et al., 2009). Dahingegen wird PDGF und PDGFR gar nicht oder nur in geringem Maße von nicht Vakzine-assoziierten Sarkomen exprimiert (HENDRICK, 1998).

Der TKI Imatinib mesylat (Gleevec® von Novartis), wurde 2005 von LACHOWICZ und Kollegen bei 9 Katzen mit unterschiedlichen Neoplasien auf seine Verträglichkeit hin untersucht. In diese Phase-I-Studie zur Dosisfindung wurden auch 4 Katzen mit FISS eingeschlossen. Eine der 9 Katzen zeigte 2 Wochen nach Therapiebeginn zahlreiche Abweichungen in Blutbild, Serumchemie und Urinanalyse, darunter eine mittelgradige Azotämie und eine hochgradige Erhöhung der Alaninaminotransferase (ALT). Bei dieser Katze waren bereits einen Monat vor Beginn der Imatinib-Therapie erhöhte Kreatininwerte gemessen worden. Bei ihr wurde die Anfangsdosis des Studienmedikaments von 1 mg/kg einmal täglich nicht weiter erhöht. Weitere

Nebenwirkungen waren mild und zum Teil durch andere neoplastische Erkrankungen bedingt. Alle 4 FISS-Katzen reagierten mit einer Stagnation des Tumorwachstums für durchschnittlich 2 Monate (LACHOWICZ et al., 2005). Bereits 1 Jahr zuvor hatten KATAYAMA und Mitarbeiter Imatinib an FISS-Zelllinien und Nacktmäusen mit FISS getestet. Dabei zeigte es sich als wirksamer Inhibitor der Autophosphorylierung des PDGFR, er vermindert dadurch die Überlebensfähigkeit der FISS-Zellen. Außerdem konnte eine *in vivo*-Aktivität dieses TKIs gegen das Wachstum von FISS am Nacktmaus-Modell nachgewiesen werden. Darüber hinaus verhindert das Medikament *in vitro* den protektiven Effekt des PDGF-BB gegenüber Doxorubicin und Carboplatin, wodurch die Sarkomzellen sensibler gegenüber der Chemotherapie wurden (KATAYAMA et al., 2004). Die erste Studie zu Masitinib (Masivet® von AB Science) bei FISS führten DALY und Kollegen durch. Das Medikament wurde im Hinblick auf Wachstumshemmung, Radio- und Chemosensibilisierung bei 2 FISS-Zelllinien untersucht. Außerdem wurde es klinisch gesunden Katzen verabreicht, um zu evaluieren, ob und wie toxisch die klinisch relevante Dosierung für diese Tierart ist. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Masitinib potenziell zur Therapie von FISS geeignet ist, da eine Wachstumshemmung der Zelllinien zu verzeichnen war (DALY et al., 2009). Auch LAWRENCE et al. konnten zeigen, dass Masitinib einen dosis-abhängigen anti-proliferativen Effekt sowohl auf FISS-Zelllinien von Primärtumoren als auch korrespondierenden Lungenmetastasen hat. Hier zeigte sich, dass je nach Dosierung Masitinib zu einer Apoptoserate von 40 bis 90 % führte, während in Abwesenheit des Wirkstoffs weniger als 5 % der Zellen apoptotisch waren (LAWRENCE et al., 2012). TUREK et al. konnten jedoch keinen Unterschied in der Radiosensitivität von normalen FISS-Zelllinien und solchen, die mit Masitinib vorbehandelt waren, feststellen. Die Strahlentherapie reduzierte dosis-abhängig das Überleben aller Zellen (TUREK et al., 2014).

1.8. Prognose

Die Prognose für Katzen, deren FISS lediglich operativ entfernt werden, ist schlecht, insbesondere wenn der Tumor nur marginal reseziert wird (LIPTAKE & FORREST, 2007). Sarkome, die bei der ersten Operation großflächig beziehungsweise radikal exstirpiert werden, rezidivieren nach median 419 beziehungsweise 325 Tagen, wohingegen marginal entfernte Tumoren bereits

nach median 66 Tagen wiederkehren (HERSHEY et al., 2000). Des Weiteren ist die mediane Überlebenszeit nach einem radikalen Eingriff mit 807 Tagen signifikant länger als nach marginaler Exzision (562 Tage) (HERSHEY et al., 2000). Dabei ist gerade die erste Operation entscheidend, da sich die Zeit bis zum Rezidiv mit jedem Eingriff verkürzt (HERSHEY et al., 2000). Weitere prognostisch wichtige Faktoren sind die anatomische Lokalisation, die Größe des Tumors, adjuvante Therapien, der histologische Grad und die Tumorart, sowie die Erfahrung des Chirurgen und die Anzahl der vorangegangenen Operationen (ROMANELLI et al., 2008; LADLOW, 2013). Zusätzlich kann das *outcome* positiv durch präoperatives Staging mittels Kontrast-CT oder -MRT beeinflusst werden (HARTMANN et al., 2015).

2. Das canine epitheliotrope T-Zell-Lymphom

Aufgrund der Vielzahl klinischer und histologischer Bilder des epitheliotropen Lymphoms werden in der Humanmedizin viele Subtypen der Krankheit beschrieben. Die Weltgesundheitsorganisation WHO legte 2005 gemeinsam mit der *European Organization for Research and Cancer Treatment* eine Klassifikation für kutane Lymphome fest, in der kutane T- und Natürliche Killer-Zell-Lymphome wie folgt unterteilt werden:

- Mycosis fungoides (MF)
 - Alibert-Bazin MF
 - Follikulotrope MF
 - Pagetoide Retikuloze (PR)
 - Elastolytisches T-Zell-Lymphom (*granulomatous slack skin*)
- Sézary Syndrome (SS)

Unter MF wird hier ausschließlich der klassische Alibert-Bazin Typ verstanden. Sie ist sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin die am häufigsten diagnostizierte Form des epitheliotropen T-Zell-Lymphoms (WILLEMZE et al., 2005; MOORE et al., 2009). Auf sie soll im folgenden Text näher eingegangen werden.

Die follikulotrope MF ist charakterisiert durch lymphatische Infiltrate im

Follikelepithel mit Aussparung der Epidermis. Da in den meisten Fällen zusätzlich eine muzinöse Degeneration der Haarfollikel stattfindet, wird sie auch follikuläre Muzinose genannt und geht in der Regel mit Alopezie einher. Die Hautveränderungen sind oft mit hochgradigem Juckreiz assoziiert (WILLEMZE et al., 2005; AHN et al., 2014).

Die PR stellt eine indolente Variante der MF dar, bei der solitäre Flecken oder Beläge mit intradermaler Proliferation neoplastischer T-Zellen das klinische beziehungsweise histologische Bild bestimmen. Wobei diese, auch Woringer-Kolopp-Typ genannte Form in der Regel an den Extremitäten lokalisiert ist und sich durch eine sehr langsame Progression und einen indolenteren Verlauf auszeichnet (WILLEMZE et al., 2005; AHN et al., 2014). Sie wird zum Teil auch als benigne eingestuft (HAGHIGHI et al., 2000). Weder extrakutane Dissemination noch Todesfälle durch Woringer-Kolopp-PR wurden bisher gemeldet (WILLEMZE et al., 2005). Bei Hunden kann die PR klinisch nicht von der MF unterschieden werden. Allerdings berichtet MORRISON von einem Hund mit einer einzelnen Läsion, die langsam fortschritt und stellt die Hypothese auf, dass diese das Äquivalent zur Woringer-Kolopp-Krankheit des Menschen darstellt (MORRISON, 2001). Möglicherweise sind in Fällen von PR häufiger die Ballen betroffen. Hier zeigen sich dann Krusten, Hypopigmentationen und Ulzerationen (SCOTT, 2000; GROSS et al., 2005). In früheren Klassifikationen wurde auch der Ketron-Goodman-Typ zur PR gezählt, die WHO stuft diese generalisierte Variante nun jedoch als aggressives epidermotropes *cluster of differentiation-8*-positives (CD8⁺) kutanes T-Zell-Lymphom oder gamma/delta-positives T-Zell-Lymphom, beziehungsweise Tumorstadium der MF ein (WILLEMZE et al., 2005).

Die extrem seltene Form des elastolytischen T-Zell-Lymphoms (*granulomatous slack skin*) zeichnet sich durch das Auftreten von erythematösen *plaques* oder Umfangsvermehrungen mit hängender, schlaffer Haut aus, die eine Prädisposition für intertrigöse Hautbereiche aufweist und gehäuft bei Frauen und jungen Patienten auftritt. Eine Assoziation mit Hodgkin-Lymphomen oder klassischer MF wird in einer Vielzahl der Fälle beschrieben (WILLEMZE et al., 2005; AHN et al., 2014).

Das Sézary Syndrom setzte sich früher aus einer Befundtrias von exfoliativer Dermatitis, generalisierter Lymphadenopathie und neoplastischen T-Zellen,

sogenannte Sézary-Zellen in Haut, Lymphknoten und peripherem Blut, zusammen (WIESELTHIER & KOH, 1990). Die *International Society of Cutaneous Lymphomas* hält das SS für bewiesen, wenn eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllt sind: mehr als 1000 Sézary-Zellen pro Kubikmeter, immunphänotypische Abweichungen (wie einem dem Überwiegen von CD4⁺ T-Zellen, so dass das CD4 zu CD8-Verhältnis über 10 liegt oder dem Verlust der T-Zell-Antigene CD2, CD3, CD4 und/oder CD5) oder der molekulare oder zytogenetische Nachweis von T-Zell-Klonen im peripheren Blut (VONDERHEID et al., 2002). Diese Form des epitheliotropen Lymphoms muss unbedingt von einer lymphatischen Leukämie mit sekundärer Beteiligung der Haut differenziert werden (GROSS et al., 2005). Das SS ist wie beim Menschen auch eine seltene Form des CETL und in beiden Spezies mit einer schlechten Prognose assoziiert (WILLEMZE et al., 2005; FONTAINE et al., 2009).

2.1. Geschichte, Ätiologie, Pathogenese

Das epitheliotrope T-Zell-Lymphom, das zu Beginn des 19. Jahrhunderts bei Menschen als Mycosis fungoides beschrieben wurde (FONTAINE et al., 2009), diagnostizierte man beim Hund erstmals 1972 (KELLY et al., 1972).

Die Ätiologie der Erkrankung ist weitgehend unbekannt und verschiedene mögliche Ursachen werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin kontrovers diskutiert. Beim Menschen und auch bei der Katze könnte eine virale Infektion von Bedeutung sein. So isolierten GOSH und Mitarbeiter Sequenzen des humanen T-lymphotropen Virus-1 (HTLV-1) in kutanen epitheliotropen Lymphomen von Menschen mit SS (GHOSH et al., 1994). Diese Ergebnisse konnten auch PANCAKE et al. ein Jahr später bestätigen (PANCAKE et al., 1995). Auch das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) wurde in lymphoproliferativen Läsionen gefunden (TRENTO et al., 2005). Es ist bekannt, dass eine Epstein-Barr-Virusinfektion Hodgkin-Lymphome, eine B-Zell-Neoplasie, hervorrufen kann (AHMED & HESLOP, 2006). Im Blut von Katzen mit kutanen Lymphomen kann oft kein FeLV nachgewiesen werden, doch im Tumorgewebe selbst konnte in einzelnen Fällen provirale FeLV-DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) identifiziert werden (CACIOLO et al., 1984; TOBEY et al., 1994; JACKSON et al., 1996). Zwei Studien berichten vom Nachweis eines Typ-C-Retrovirus, das mit dem FeLV verwandt ist, im Blut leukämischer Hunde, allerdings konnte dabei kein kausaler Zusammenhang

zwischen der Virusinfektion und der Tumorerkrankung bewiesen werden (SAFRAN et al., 1992; GHERNATI et al., 2000).

Eine weitere, in der Literatur diskutierte Möglichkeit der Prädisposition für epitheliotrope T-Zell-Lymphome sind ein chronischer Antigenstimulus und/oder Langerhanszellabnormitäten, die zur chronischen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führen, was dann in der Entartung dieser Zellen resultiert (WEINSTOCK & HORM, 1988; BURG et al., 2001). Eine ähnliche Theorie stellten LAMBERG und BUNN bereits 1979 auf, da sie erkannten, dass eine Vielzahl von Patienten mit epitheliotropen T-Zell-Lymphomen eine oft langjährige klinische Vorgeschichte von chronischer Dermatitis aufwies. Aus diesem Grund postulierten sie, dass dieser chronische Entzündungsprozess zur Entwicklung der Mycosis fungoides führen kann (LAMBERG & BUNN, 1979). SHAPIRO und PINTO hingegen kamen in ihrer Untersuchung zu dem Schluss, dass es sich bei epitheliotropen T-Zell-Lymphomen eher um spontane Neoplasien handelt als um Tumoren, die durch chronische Entzündungen hervorgerufen werden (SHAPIRO & PINTO, 1994). Und auch MEHRANY et al. konnten keinen Beweis für den Zusammenhang von Atopie und epitheliotropen T-Zell-Lymphomen beziehungsweise dem SS erbringen (MEHRANY et al., 2003).

In einer ersten tiermedizinischen Studie zur Korrelation von atopischer Dermatitis und CETL konnten SANTORO und Kollegen zeigen, dass das Risiko der CETL-Entstehung signifikant mit dem Bestehen einer atopischen Dermatitis assoziiert ist. In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die Entwicklung einer MF bei Hunden mit Atopie zwölfmal wahrscheinlicher ist als bei Hunden, die keine allergischen Hauterkrankungen aufweisen (SANTORO et al., 2007). Ansonsten ist der Zusammenhang zwischen chronischer Dermatitis und CETL in der veterinärmedizinischen Literatur nur spärlich dokumentiert (FONTAINE et al., 2009).

T-Lymphozyten gelangen im Falle von kutanen Entzündungen durch äußerer oder viraler Schädigung aus den postkapillären Venolen in die Haut. Kommt es nun zu Dysregulationen der Lymphozytenfraktion können maligne T-Zellen Rezeptoren wie das kutane Lymphozyten-Antigen oder den CC-Chemokinrezeptor-4 exprimieren, die die Exozytose der Lymphozyten in die Haut und ihre Bindung an epidermale Keratinozyten und Langerhanszellen hervorrufen (KIM et al., 2005). Dies ist ein Grund für den Epitheliotropismus der Erkrankung. Und auch die

Expression von $\beta 1$ -*integrin intercellular adhesion molecule* könnte eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von Oberflächenrezeptoren und somit im epitheliotropen Verhalten der neoplastischen T-Lymphozyten spielen (DAY, 1999).

2.2. Inzidenz

Unter den Hauttumoren ist das CETL eine seltener auftretende Erkrankung (GOLDSCHMIDT & SHOFER, 1992; SCOTT, 2000; GROSS et al., 2005). Ihr Anteil an der Gesamtheit der kutanen Neoplasien wird mit 1 % angegeben, wobei hier sowohl epitheliotrope als auch nicht-epitheliotrope Lymphome zusammengefasst wurden (GOLDSCHMIDT & SHOFER, 1992). In einer Analyse von 130.684 Hunden, die bei einer britischen Gesellschaft versichert waren, wurde bei 103 Hunden die Diagnose Lymphom gestellt (EDWARDS et al., 2003). Die Inzidenz der malignen Lymphome wird mit 7 % bis 24 % aller caninen Neoplasien angegeben und nur 3 % bis 8 % treten in Form von kutanen Lymphomen auf (VAIL & YOUNG, 2007). Bei einer Untersuchung der Patientenpopulation der University of Florida errechneten SANTORO und Kollegen für CETL eine Prävalenz von 0,02 % (SANTORO et al., 2007). Allerdings ist zu vermuten, dass gerade spezialisierte dermatologische Praxen und Überweisungskliniken die Krankheit häufiger sehen als andere. Hier schwanken die Fallzahlen zwischen 2 und 7 CETL pro 1000 Dermatosen in einem Zeitraum von 4 bis 5 Jahren. Bei der Aufarbeitung einer Vielzahl an Fallberichten über CETL waren Cockerspaniel und Boxer überrepräsentiert, was für eine Prädisposition dieser Rassen spricht (FONTAINE et al., 2009). Wobei Boxer eine generelle Prädisposition für T-Zell-Lymphome aufweisen (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; PONCE et al., 2010). Eine Geschlechtsprädisposition wie in der Humanmedizin, wo Männer 1,5- bis zweimal häufiger betroffen sind als Frauen, konnte in bisherigen veterinärmedizinischen Studien nicht festgestellt werden. In einer Analyse der 72 in der Literatur gelisteten CETL-Fälle waren 38 männliche und 34 weibliche Tiere betroffen, das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 8,6 Jahren (FONTAINE et al., 2009).

2.3. Klinisches Bild

Wie bereits erwähnt wird in der Humanmedizin median 4 bis 6 Jahre nach Auftreten der ersten Symptome die Diagnose MF gestellt (AHN et al., 2014).

Auch in der Tiermedizin vergeht oft längere Zeit bis die endgültige Diagnose gestellt wird. BEALE und BOLON berichten von 6 von 26 Hunden mit CETL, die an chronischer Dermatitis litten (BEALE & BOLON, 1993). 2006 dokumentierten BHANG und Kollegen den Fall eines siebenjährigen Yorkshire Terrier mit CETL, dessen chronische Entzündung der Haut bereits 6 Jahre andauerte (BHANG et al., 2006). In ihrer Literaturrecherche errechneten FONTAINE und Kollegen eine mittlere Zeit von 5,5 Monaten zwischen dem Auftreten der ersten kutanen Veränderungen und der Diagnosestellung (FONTAINE et al., 2009). In einer weiteren Studie des gleichen Autors mit 30 Hunden lag diese Zeitspanne bei median 3,8 Monaten und keiner der 25 Hunde, von denen eine ausführliche klinische Vorgeschichte vorlag, hatte vor dem Auftreten des CETL an chronischen Dermatitiden gelitten (FONTAINE et al., 2010).

Betroffene Hunde werden wegen unterschiedlichster Hautveränderungen vorgestellt, denn das CETL kann, wie beim Menschen auch, in seiner klinischen Präsentationen vielen Dermatitiden ähneln (BEALE & BOLON, 1993; SCOTT, 2000; CAMPBELL, 2004; GROSS et al., 2005). Mukokutane Übergänge und die Maulschleimhaut sind häufig mit betroffen (MORRISON, 2001). Die oben aufgeführte Klassifikation der Humanmedizin der epitheliotropen T-Zell-Lymphome ist beim Hund nur bedingt anzuwenden, da sich eine alleinige Charakterisierung anhand der kutanen Veränderungen schwierig gestaltet. MOORE et al. untersuchten 2009 eine Fallserie mit 56 Hunden, wobei 39 Patienten an MF, 16 an einer PR und ein einzelner an SS litten (MOORE et al., 2009). Die 2001 eingeführte Einteilung nach SCOTT beschreibt die klinischen Symptome und Stadien wie folgt (SCOTT, 2000):

- (1) Exfoliative Dermatitis
- (2) *Plaques*/Knoten
- (3) Ulzerative Veränderungen der Maulschleimhaut
- (4) Mukokutane Form

Allerdings betonen FONTAINE et al. in ihrer Studie von 2010, dass eine tatsächliche Kategorisierung oft schwierig ist, da sich die Symptome oft überschneiden beziehungsweise gleichzeitig auftreten (FONTAINE et al., 2010).

Die exfoliative Dermatitis kann alle kutanen Bereiche des Körpers betreffen und die Veränderungen treten meist generalisiert auf. Allerdings sind in der Regel

Kopf- und Rumpfreionen schwerer betroffen als die Extremitäten. Dabei kann es zu Hautschuppungen, Erosionen oder sogar Ulzerationen sowie Hypopigmentationen und Alopezien kommen (GROSS et al., 2005). Kutane Hämorrhagien können den Eindruck einer Hyperpigmentation vermitteln. Bei einigen Tieren ist die Entzündung auch mit Pruritus assoziiert und durch das Kratzen der Hunde kommt es sekundär zu Exkorationen (GOLDSCHMIDT & SHOFER, 1992). Lymphadenopathien sind keine Seltenheit und können entweder durch Lymphknoteninvasion neoplastischer Lymphozyten bedingt sein oder eine, durch sekundäre Infektionen der Hautläsionen bedingte reaktive Vergrößerung der Lymphknoten darstellen (GROSS et al., 2005). Die exfoliative Dermatitis wird nur selten bei Hunden mit CETL gesehen, da sie wahrscheinlich oft nicht vom Besitzer bemerkt wird und die Tiere häufig erst beim Fortschreiten der Krankheit ins Stadium der *plaques* und Knoten vorgestellt werden (FONTAINE et al., 2009). Während die unterschiedlichen Phasen beim Menschen in der Regel gut abgegrenzt werden können, werden Hunde mit Veränderungen unterschiedlicher Schweregrade erstmals einem Tierarzt vorgestellt. So können sie sich sowohl mit rötlich fleckigen Körperarealen (*patches*) als auch mit Hautveränderungen mit Auflagerungen (*plaques*) präsentieren. Häufig entwickeln sich auch bald darauf die ersten kutanen Knötchen (GROSS et al., 2005). Zu Beginn sind die Läsionen meist noch recht klein und treten nur vereinzelt, häufig am Kopf oder auch am Rumpf auf. Betroffene Areale sind oft schuppig oder sogar krustig, zum Teil auch haarlos und können bereits erosiv oder ulzerativ verändert sein (MORRISON, 2001). Die Knoten können sich aus vorher bestehenden *patches* und *plaques* entwickeln, können aber auch an zuvor noch unauffälligen Lokalisationen entstehen. Häufig zeigen Tiere in diesem Krankheitsstadium weniger Juckreiz als solche, die lediglich fleckige Veränderungen aufweisen. Sekundäre Infektionen führen jedoch häufig zu einer Verschlimmerung des Pruritus (FONTAINE et al., 2009). Die oft eher schmerzhaften Knoten können nur wenige Millimeter an Größe aufweisen, aber auch auf eine Größe von mehreren Zentimetern heranwachsen (MORRISON, 2001). In dieser auch als Tumor-Stadium bezeichneten Krankheitsphase kommt es in vielen Fällen zur Metastasierung, wovon regionäre Lymphknoten primär betroffen sind (MOORE et al., 1994). Mit dem Fortschreiten der Krankheit wachsen die Läsionen und neben einem gehäufteren Auftreten von Ulzerationen und Rötungen kommt es auch vermehrt zu zentralen Nekrosen in den Veränderungen (GOLDSCHMIDT & SHOFER,

1992).

Sowohl die orale als auch die mukokutane Form des CETL ist keine Seltenheit. In einer Studie von MOORE und Mitarbeitern zeigten 25 von 54 CETL eine starke Tendenz zur Beteiligung mukokutaner Übergänge, wie den Lippen, dem Planum nasale, der Augenlider, der Perianalregion sowie des perivulvären Bereichs. Bei 16 Hunden war die orale Mukosa mit betroffen (MOORE et al., 2009). FONTAINE et al. fanden bei der Untersuchung von 30 CETL-Fällen 3 Tiere, bei denen ausschließlich mukokutane Übergänge betroffen waren und einen Hund, der Mukosaulzera ohne kutane Beteiligung aufwies. Weitere 14 Hunde dieser Studie litten gleichzeitig an Haut- und Schleimhautveränderungen sowie Läsionen an mukokutanen Übergängen. Außerdem konnten die Autoren feststellen, dass gerade das mukokutane Gewebe von Nase und Lefzen am häufigsten betroffen ist, 13 der 30 Hunde wiesen hier neoplastische Veränderungen auf (FONTAINE et al., 2010). Des Öfteren treten auch Ulzerationen an den Ballen der Tiere auf (WILCOCK & YAGER, 1989; FONTAINE et al., 2010).

2.4. Histologisches Bild

Allen Formen des CETL gemein ist ihr ausgeprägter Tropismus zur Epidermis. In diesem Fakt ähneln sie der humanen Mycosis fungoides, doch der zusätzliche Tropismus der neoplastischen T-Lymphozyten für adnexale Strukturen wie Haarfollikel, apokrine Schweiß- und Talgdrüsen ist ein spezifisches Charakteristikum der CETL. Die epitheliotropen Lymphozyten können diffus in der Epidermis verteilt sein oder einzelne, fokale Aggregate bilden, die sich makroskopisch als Pusteln darstellen und als Pautriersche Mikroabszesse bezeichnet werden (MOORE et al., 1994; SCOTT, 2000; GROSS et al., 2005). MOORE und Kollegen berichten in ihrer Untersuchung von 23 CETL von 5 Fällen, in denen die lymphatischen Infiltrate, mit Ausnahme einiger reaktiver Zellen unterschiedlicher Zelllinien (Lymphozyten, Plasmazellen, Histiozyten, in Ausnahmen auch Granulozyten) in der Dermis fast ausschließlich auf die Epidermis beschränkt blieben, was dem Bild einer generalisierten PR in der Humanonkologie gleicht. Sind die neoplastischen Zellen bereits in das Stratum papillare des Coriums vorgedrungen und haben auch die Übergangszone von Epidermis zu Dermis durchsetzt, so bezeichnen MOORE et al. dies als *plaque stage*. Eine Vorstufe davon stellt die nur oberflächliche Infiltration der Dermis dar, sie wird als *patch stage* klassifiziert und ist häufig mit dem *plaque stage*

vergesellschaftet, weswegen die Autoren diese beiden Stadien in einer späteren Studie als *patch-plaque stage* bezeichnen. Wenn die epitheliotropen Lymphozyten bereits bis ins Stratum reticulare des Coriums und in die Subkutis vorgedrungen sind, sprechen MOORE et al. vom Tumorstadium. Diese Ausprägung der Erkrankung fanden die Autoren in 15 von 23, beziehungsweise 38 von 54 Hunden. Adnexale Strukturen waren in beiden Studien bei allen Hunden infiltriert (MOORE et al., 1994; MOORE et al., 2009). Im Falle einer MF kommt es durch die Invasion der neoplastischen Zellen zur Akanthose. Auch eine unterschiedlich ausgeprägte Hyperkeratose, sowie gelegentlich auch Spongiose der Epidermis sind erkennbar (GROSS et al., 2005). Mit Progression der Erkrankung und Zunahme der epidermalen Infiltration werden auch Erosionen und Ulzerationen sichtbar. Gerade in der dermal-epidermalen Übergangszone wird oft eine vermehrte Pigmentfreisetzung der Melanozyten beobachtet. Doch vereinzelt kommt es auch zur Regression der Läsionen in Form einer Fibrosierung der Dermis (SCOTT, 2000; GROSS et al., 2005). Durch Nekrotisierung einzelner Keratinozyten kann es zur Nekrose und Ulzeration der Epidermis kommen (GROSS et al., 2005). FONTAINE und Kollegen berichten in ihrer Literaturrecherche, dass es kontrovers diskutiert wird, ob der Epitheliotropismus mit Fortschreiten und Schwere der dermalen Infiltration abnimmt oder er in jedem Krankheitsstadium vorhanden ist (FONTAINE et al., 2009). Die 5 CETL, die FOURNEL-FLEURY und Mitarbeiter in ihrer Studie untersuchten, zeigten ein unterschiedliches Maß an Epitheliotropismus, was unter anderem vom Krankheitsstadium abhing (FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Die Morphologie der infiltrierenden Lymphozyten wird in den meisten Studien als sehr unterschiedlich beschrieben und ist meist vom Stadium der Erkrankung bestimmt. In der frühen Krankheitsphase des *patch-plaque stage* stellen sich die neoplastischen Zellen meist als kleine bis mittelgroße, hyperchromatische Lymphozyten mit unregelmäßigem, zum Teil spiraligem Kern (fingerförmig) und wenig Zytoplasma dar (DAY, 1999; FOURNEL-FLEURY et al., 2002; MOORE et al., 2009). Die Mitoserate ist in diesem Krankheitsstadium niedrig (GROSS et al., 2005). Im Tumorstadium infiltrieren vorwiegend große Lymphozyten mit großen ovalen, teilweise auch gefalteten Nuclei und reichlich eosinophilem bis amphophilem, oft aber nur wenig angefärbtem Zytoplasma das Gewebe, wodurch die Histologie eher einem histiozytären Bild gleicht (GROSS et al., 2005;

MOORE et al., 2009). PONCE und Kollegen fanden in ihrer Untersuchung 25 Fälle von kutanen T-Zell-Lymphomen aus unregelmäßigen, cerebriformen Zellen mit niedrigem mitotischem Index, die sie als typisches Erscheinungsbild einer klassischen MF einstufen. Außerdem beschreiben die Autoren 12 weitere Fälle vom monozytoiden Typ mit reichlich blassem Zytoplasma, runden Zellkernen mit feinem Chromatin und gut sichtbarem Nucleolus, die einen Epitheliotropismus auswiesen (PONCE et al., 2010). Dieses Erscheinungsbild wurde auch in einem von 5 Fällen von FOURNEL-FLEURY et al. nachgewiesen. 2 weitere CETL-Fälle stellten sich als *large granular lymphocyte*-Typ dar mit azurophilen Granula in ihrem ansonsten nur blass gefärbten Zytoplasma und geringgradig unregelmäßiger Kernstruktur (FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Bei Hunden mit SS wird die Tumorzellpopulation von kleinen, cerebriformen Lymphozyten mit hyperchromatischem gewundenem Nucleus bestimmt, diese werden auch als Sézary- oder Lutzner-Zellen bezeichnet (SCOTT, 2000; CAMPBELL, 2004; GROSS et al., 2005). Diese Zellen sind außer in den kutanen Läsionen auch in Lymphknoten vorhanden und zirkulieren im peripheren Blut. Auch in anderen Organen wie Milz, Leber, Lunge, Herz und Nieren können die Sézary-Zellen in einigen Fällen nachgewiesen werden (FOSTER et al., 1997; SCOTT, 2000; GROSS et al., 2005).

Eine Immunphänotypisierung ist mithilfe von CD-Antigenen möglich. Die humane MF ist in 90 % der Fälle ein Lymphom der $CD4^{+}$ - $\alpha\beta$ -T-Zellen, also der T-Helferzellen, CD8 wird nur selten exprimiert (KNOWLES, 1989; RALFKIAER, 1991). Dahingegen sind in 50 % der PR in der Humanonkologie die T-Lymphozyten entweder vom $CD4^{+}CD8^{+}$ (T-Suppressorzellen)- oder vom $CD8^{+}$ -Phänotyp, aber auch $CD30^{+}$ Tumorzellen wurden schon nachgewiesen (MIELKE et al., 1989; BERTI et al., 1991; LEBOIT, 1991; HAGHIGHI et al., 2000; WILLEMZE et al., 2005). Das immunphänotypische Bild der CETL stellt sich wesentlich unterschiedlich zu der des Menschen dar. Hier wird die Expression von $CD4^{+}CD8^{-}$ zytotoxischen T-Zellen in 80 % der Hunde nachgewiesen, in den restlichen 20 % wird die Population neoplastischer Zellen von natürlichen Killerzellen gebildet, die weder CD4 noch CD8 exprimieren (MOORE et al., 2009). Eine alleinige Expression von CD4 konnte in CETL bisher nicht nachgewiesen werden (MOORE et al., 1994). MAGNOL et al. konnten in ihrer Studie eine gemischte Expression verschiedener T-Zell-Marker in dermalen

Lymphozyten zeigen, darunter auch CD4⁺CD8⁺-Lymphozyten (MAGNOL et al., 1996). Eine CD4-Expression konnten auch MOORE und Mitarbeiter feststellen, allerdings beschränkte sich diese auf reaktive Zellen der Dermis und der Submukosa, wie Makrophagen und dendritische Zellen (MOORE et al., 1994). Auch der klassische T-Zell-Marker CD3 wird von den neoplastischen Zellen der CETL exprimiert (MOORE et al., 1994; MOORE et al., 2009). CD5 ist ein immunhistologischer Marker für T-Lymphozyten und eine B-Lymphozytensubpopulation. In der Studie von MOORE und Kollegen waren in nur 7 von 19 Fällen die epitheliotropen Lymphozyten CD5-positiv, wobei bei diesen Hunden auch dermale Lymphozyten eine diffuse CD5-Expression zeigten. Der positive Nachweis der CD5-Expression war sowohl im *patch-plaque*- als auch im Tumorstadium nur sehr geringgradig ausgeprägt und somit unabhängig vom Krankheitsstadium (MOORE et al., 1994). In einer späteren Untersuchung fanden MOORE und Mitarbeiter heraus, dass in 64 % der analysierten CETL keine CD5-Expression stattfand, wobei sie in 73 % aller $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphome und nur 29 % aller $\alpha\beta$ -T-Zell-Lymphome fehlte (MOORE et al., 1996). Zusätzlich scheint die Expression von CD5 bei $\alpha\beta$ -T-Zellen vom Krankheitsstadium abhängig zu sein. Während in *patch-plaque stage*-Läsionen die T-Zellen nahezu alle CD5-positiv sind, fehlt die Expression dieses Antigens bei Veränderungen im Tumorstadium. Eine solche Korrelation zwischen CD5-Expression und Krankheitsstadium konnte bei $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphomen nicht nachgewiesen werden. Überhaupt ist die CD5-Expression bei diesen Tumoren eher selten (MOORE et al., 2009). Dieses Fehlen der CD5-Expression könnte eventuell hilfreich bei der Differenzierung zwischen CETL und reaktiver lymphoider Dermatitis sein (FONTAINE et al., 2009). Wie bereits erwähnt können T-Lymphozyten durch weitere Oberflächenproteine unterschieden werden, die TCR, die durch 2 Ketten charakterisiert sind, entweder $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ (DAY, 1999). Der $\gamma\delta$ -Phenotyp ist bei CETL wesentlich häufiger. In der Analyse von MOORE et al. wurden in 18 von 29 Hunden mit MF und in 6 von 8 Fällen von PR T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TCR nachgewiesen (MOORE et al., 1996). In einer späteren Studie wurden $\gamma\delta$ -TCR in 17 von 38 MF-Fällen nachgewiesen, während in Läsionen in Form der PR alle 15 Tiere $\gamma\delta$ -TCR exprimierten (MOORE et al., 2009). Thy-1 steht für *thymocyte differentiation antigen 1*, ist auch bekannt als CD90 und wird beim Hund von allen peripheren T-Zellen exprimiert (MOORE et al., 1990; MOORE et al., 1992). Die Expression dieses Antigens konnte von MOORE et al. in

Lymphozyten der Dermis und der Submukosa in 19 von 22 Fällen nachgewiesen werden, doch nur in 10 dieser Fälle waren auch die epitheliotropen Lymphozyten Thy-1-positiv (MOORE et al., 1994). BRACHELENTE et al. berichteten 2015 von einem Dackel, dessen CETL eine CD3- und CD20-Coexpression zeigte (BRACHELENTE et al., 2015). Ein früherer Fallbericht wies die gleichzeitige Expression von CD3 und c-Kit im CETL eines Boston Terriers nach (SHIOMITSU et al., 2012).

Ki-67 ist ein Protein, das im Kern proliferierender Zellen exprimiert wird, es spiegelt die Zellzyklusaktivität eines Gewebes wider und wird somit immunhistologisch als Proliferationsmarker verwendet (BERTI et al., 1991; SEIGNEURIN & GUILLAUD, 1991). Er wird in der Humanmedizin schon seit Längerem als prognostischer Marker verwendet, da der Anteil der Ki-67⁺ Zellen mit der Malignität von Lymphomen korreliert ist (GERDES et al., 1984; SEIGNEURIN & GUILLAUD, 1991). Auch bei Hunden wurde dieser Zusammenhang nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass von hochgradiger Malignität auszugehen ist, wenn mehr als 21 % der Zellen Ki-67 exprimieren. In Bezug auf diesen Schwellenwert zählt die MF beim Hund zu den weniger malignen Lymphomformen, da sich hier nur 16 % der Zellen Ki-67-positiv zeigten (FOURNEL-FLEURY et al., 1997). Der Ki-67-Index steigt mit Progression des CETL. Während er bei Hunden im *patch-stage* bei nur 13 % liegt, wird die Expression des Antigens in 18 % der Zellen von Tieren mit knotigen Hautveränderungen des CETL nachgewiesen (MAGNOL et al., 1996). Auch der Nachweis von *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) ist ein hilfreicher Marker zur Bestimmung der Malignität kutaner Läsionen. So ist der Index dieses Proliferationsmarkers im Tumorstadium wesentlich höher als im *patch-plaque-stage*. Sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis kann die T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden (MURPHY & OLIVRY, 2000).

2.5. Diagnostisches Vorgehen

Der zytologischen oder histologischen Untersuchung sollte in der Regel eine eingehende klinische Untersuchung, sowie eine Bestimmung der Blut- und Urinwerte zur Evaluation des aktuellen Gesundheitsstatus des Patienten vorausgehen. Mithilfe von Röntgenaufnahmen des Thorax in mindestens 3 Ebenen können mediastinale Massen identifiziert werden und eine Ultraschalluntersuchung kann die Beteiligung innerer Organe detektieren (VAIL

& YOUNG, 2007).

Anhand des Vorberichts und der klinischen Präsentation können gerade erfahrene Tierärzte oft schon eine Verdachtsdiagnose stellen. Eine zytologische Untersuchung kann weitere Hinweise auf ein CETL geben. Sowohl Abklatschpräparate als auch Feinnadelaspirate sind zur Untersuchung geeignet. Allerdings kann hierbei anhand der Rundzellen nur die Diagnose eines hämatopoetischen Tumors gestellt werden, eine genauere Differenzierung ist nicht möglich, da die Lymphozyten nicht unbedingt atypisch verändert sein müssen. Außerdem ist es nicht möglich zytologisch eine Monoklonalität der Lymphozyten zu beweisen. Auch die Differenzierung atypischer lymphatischer Zellen von Histozyten ist lichtmikroskopisch in der Regel nicht möglich (FONTAINE et al., 2009).

Für eine endgültige Diagnose ist die histopathologische Untersuchung von einer oder mehreren Biopsieproben nötig. Damit kann sowohl der Epitheliotropismus als auch der Subtyp der CETL nachgewiesen werden (FONTAINE et al., 2009). Dabei sollte die Lokalisation so gewählt werden, dass möglichst repräsentative Präparate gewonnen werden. Infizierte, ulzerierte oder nekrotische Läsionen sind für den Pathologen meist eher unbrauchbar. Daher sollten Teilstücke von erythematösen oder depigmentierten Arealen genommen werden, aber auch ganze Knoten oder *plaques* eignen sich zur Untersuchung (CAMPBELL, 2004; GROSS et al., 2005; VAIL & YOUNG, 2007).

Da es sich beim CETL, wie bei allen Lymphomen um eine monoklonale Lymphozytenpopulation handelt, weisen alle neoplastischen Zellen die gleichen genomischen Merkmale auf, die von einer neoplastisch veränderten T-Zelle abstammen. Diese Monoklonalität kann durch eine PCR für *antigenetic rearrangement* (PARR) nachgewiesen werden. Diese Untersuchung macht sich zunutze, dass jedes Lymphom DNA-Regionen hat, die in Länge und Sequenz einzigartig sind (BURNETT et al., 2003). Diese identischen DNA-Sequenzen liegen bei T-Zell-Lymphomen in unterschiedlichen Regionen des TCR (VAIL & YOUNG, 2007). Dahingegen sind reaktive Lymphozyteninfiltrate eine polyklonale Zellpopulation. Dadurch kann mit PARR eindeutig zwischen Neoplasie und reaktivem Prozess unterschieden werden. Außerdem eignet sie sich zur Therapiekontrolle, denn ist die Behandlung erfolgreich, reduziert sich die Anzahl der Zellklone, was dann mit PARR nachgewiesen werden kann

(BURNETT et al., 2003; LANA et al., 2006). Dieser diagnostische Test wird in der Humanmedizin schon längere Zeit angewendet, um im Blut zirkulierende Tumorzellen nachzuweisen, Hyperplasien von Neoplasien zu unterscheiden und letztlich auch zur Therapiekontrolle nach chemotherapeutischer Behandlung von Leukämien (LANA et al., 2006). In der Untersuchung von BURNETT und Mitarbeitern von 77 Hunden mit lymphatischen Neoplasien lag die Sensitivität des Tests bei 91 % und die Spezifität bei 95 % (BURNETT et al., 2003). Außerdem korrelieren die Ergebnisse dieses Diagnoseverfahrens mit dem klinischen Krankheitsstadium und im Blut zirkulierende Tumorzellen werden besser erkannt (LANA et al., 2006). Falsch negative Ergebnisse können durch die Anwendung der falschen Primer entstehen. Außerdem werden entartete natürliche Killerzellen mit dieser Methode nicht erfasst (DREITZ et al., 1999). Liegt eine Infektion mit *Ehrlichia canis* vor, kann es zu falsch positiven Resultaten kommen (VERNAU & MOORE, 1999).

2.6. Therapie

Für die Behandlung des CETL gibt es aktuell noch kein standardisiertes Vorgehen, da bisher keine Therapieform gefunden wurde, die zu guten und länger anhaltenden Erfolgen führte. Therapieformen, die bereits evaluiert wurden und deren Einfluss auf die Prognose sollen hier zusammengefasst werden.

2.6.1. Lokale Therapie

Eine operative Entfernung des CETL ist nur zu empfehlen, wenn es sich um einzelne, solitäre Umfangsvermehrungen handelt. Daher sollte mit einem eingehenden klinischen Staging das Vorliegen weiterer Tumoren, sowie eine Dissemination der Erkrankung sicher ausgeschlossen werden. Eigentlich sollte die chirurgische Exzision nur als initiale Therapie zur Reduktion der Tumorbürde angesehen und eine systemische zytostatische Therapie immer angeschlossen werden, da das Lymphom als hämatopoetischer Tumor immer als eine systemische Erkrankung angesehen werden muss (DE LORIMIER, 2006). Auch eine adjuvante Radiotherapie kann die Prognose der operierten Patienten verbessern (BLACKWOOD, 2011).

Der Erfolg der lokalen Therapie, der in der Humanmedizin wichtigsten Maßnahme, wird in der Veterinärmedizin vor allem durch die geringe Toleranz der Hunde gegenüber topisch applizierten Medikamenten eingeschränkt. Der

zytotoxische Effekt dieser Präparate ist zeitabhängig, da sie erst nach dem Einziehen auch in der Tiefe wirken können. Doch aufgetragene Salben, Sprays oder Lotionen werden schnell abgeleckt und Shampoos können oft nicht ausreichend und lange genug einmassiert werden (DE LORIMIER, 2006).

Lokale Glukokortikoide, wie Salben oder Cremes werden in der Humanmedizin mit großem Erfolg eingesetzt, mit Ansprechraten von 82 % bis 94 %. Allerdings beziehen sich diese Zahlen auf den Einsatz bei frühen, oberflächlichen Läsionen, also CETL im *patch-stage* (APISARNTHANARAX et al., 2002; KNOBLER, 2004). Da die Erkrankung bei Hunden selten in einem solchen frühen Stadium diagnostiziert wird, ist ein Therapieerfolg hier fraglich und bisher gibt es keine veröffentlichten Studien zur Effektivität dieser Behandlung. Doch es ist nicht auszuschließen, dass Tiere im *patch-plaque-stage* von dieser Therapie profitieren könnten, wenn nicht in Form einer Remission, dann vielleicht zumindest durch einen Rückgang der Symptome (DE LORIMIER, 2006).

Das Alkylans Mechlorethamin kann ebenfalls topisch bei CETL angewendet werden. Es leitet sich vom im ersten Weltkrieg als Kampfgas verwendeten Senfgas ab und wurde in den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts als wirksames Chemotherapeutikum erkannt (CHUN et al., 2007). Die topische Anwendung von Mechlorethamin bei Hunden mit CETL ist gut beschrieben und erzielt oft gute Ergebnisse (BEALE & BOLON, 1993; DONALDSON & DAY, 2000). Ein großer Vorteil dieses Alkylanz ist die geringe systemische Absorption bei seiner lokalen Anwendung, wodurch Nebenwirkungen eine Seltenheit sind (KNOBLER, 2004). Doch auch hier ist das meist fortgeschrittene Stadium des CETL bei Erstvorstellung ein limitierender Faktor, da auch Mechlorethamin nur im *patch-plaque-stage* effektiv ist. Außerdem ist das Agens kanzerogen und kann bei chronischer Exposition zu Hautreaktionen führen. Dieses Risiko für Besitzer und tiermedizinisches Personal ist nicht zu unterschätzen. Daher wird es nicht routinemäßig in der Veterinärdermatologie angewendet (WILSON et al., 2001; ANGUS & DE LORIMIER, 2004).

Tretinoin ist ein nicht-aromatisches Retinoid der ersten Generation. Die natürlich vorkommende all-trans-Retinsäure ist als Creme auf dem Markt. Zwar gibt es zur Anwendung dieser Creme noch keine veterinärmedizinischen Veröffentlichungen, doch DE LORIMIER berichtete 2006 davon, dass der Veterinärdermatologe K.L. Campbell Tretinoin bereits bei einigen Hunden erfolgreich eingesetzt habe (DE

LORIMIER, 2006).

Lymphozyten und somit auch lymphoproliferative Krankheiten sind sehr strahlensensitiv, weswegen sich die Radiotherapie sehr gut zur Behandlung lokaler Läsionen eignet (BLACKWOOD, 2011). Die palliative Bestrahlung umschriebener CETL kann zu Schmerzlinderung und Verkleinerung störender Umfangsvermehrungen, beispielsweise in der Maulhöhle führen und häufig kann auch in fortgeschrittenen, voluminösen Tumoren eine lokale Langzeitkontrolle erreicht werden (WILSON et al., 2001; HOPPE et al., 2004). In der Humanmedizin werden Patienten in frühen Stadien der MF mit der sogenannten *total skin electron beam therapy* behandelt. Dabei wird die Haut täglich in kleinen Fraktionen über mehrere Wochen bestrahlt und zum Teil werden Remissionraten von bis zu 100 % erreicht, während oft nur leichte bis moderate kutane Nebenwirkungen auftreten (WILSON et al., 2001; APISARNTHANARAX et al., 2002; HOPPE et al., 2004; KNOBLER, 2004). Allerdings neigen epitheliotrope T-Zell-Lymphome in progressiveren Stadien zur Rezidivierung nach dieser Behandlung (APISARNTHANARAX et al., 2002). Eine modifizierte Form dieser Therapiemethode wurde von PRESCOTT und GORDON bei Hunden untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse wurden 2004 auf einer Konferenz vorgestellt. Darin heißt es, dass der Therapieerfolg bei einem der Hunde über 20 Monate anhielt und die Therapie von allen Tieren gut toleriert wurde (PRESCOTT & GORDON, 2004). RECHNER et al. untersuchten diese Art der Bestrahlung an Hundekadavern und kamen zu dem Schluss, dass eine adäquate Tiefe erreicht und damit eine effektive Behandlung möglich wäre. Diese ist jedoch mit einem nicht unerheblichen zeitlichen Aufwand verbunden, da das Protokoll an den jeweiligen Patienten angepasst werden muss (RECHNER et al., 2011).

Die Effektivität vieler weiterer in der Humanmedizin häufig eingesetzter Therapien wurden bisher nicht bei Hunden mit CETL evaluiert. So werden mit dem topisch angewandten Alkylanz Carmustin beim Menschen gute Erfolge in der Behandlung des frühen CETL erzielt (WILSON et al., 2001; ANGUS & DE LORIMIER, 2004; HOPPE et al., 2004; KNOBLER, 2004). Es hat den Vorteil, dass es im Gegensatz zu Mechlorethamin nur wenig hautreizend ist, allerdings wird es dafür besser absorbiert und kann somit auch zu systemischen Nebenwirkungen, wie Myelosuppression und Pneumonien führen (WILSON et al., 2001; HOPPE et al., 2004; KNOBLER, 2004; WANG & SONG, 2008). In

einem humanmedizinischen Fallbericht wird der erfolgreiche Einsatz von Zytarabin und Carmustin beschrieben. Der Patientin mit follikulotroper MF wurden einprozentige Lösungen der Medikamente mit nassen Auflagen appliziert, was letztlich zu einer kompletten Remission führte (HEISIG et al., 2016). Auch hier muss jedoch mit einem gesteigerten Gesundheitsrisiko für Besitzer und veterinärmedizinischem Personal gerechnet werden.

Mit Remissionsraten über 60 % bei oberflächlichen epitheliotropen T-Zelllymphomen ist auch die Anwendung des Gels des synthetischen Retenoids Bexarotene eine Therapieoption in der Humanonkologie (APISARNTHANARAX et al., 2002; KNOBLER, 2004). Allerdings ist das Medikament relativ teuer (KNOBLER, 2004) und mit lokalen Nebenwirkungen bei 70 % der Behandelten ebenfalls mit Vorsicht anzuwenden (APISARNTHANARAX et al., 2002; KNOBLER, 2004).

Eine Kombination einer Phototherapie mit ultravioletten Strahlen und dem *photosensitizer* Psoralen, der vor der UVA-Bestrahlung oral aufgenommen wird, brachte ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse in der Humanmedizin (WILSON et al., 2001; APISARNTHANARAX et al., 2002; HOPPE et al., 2004; KNOBLER, 2004).

2.6.2. Systemische Therapie

Kortikosteroide wie Prednisolon sind katabole Hormone, die nach Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren die DNA-Synthese hemmen und so zur Apoptose führen (CZOCK et al., 2005). Sowohl physiologische als auch neoplastische Lymphozyten sind sehr sensibel für diese Wirkstoffe, weswegen sie in einer Vielzahl von Chemotherapieprotokollen zur Behandlung verschiedener Lymphomformen integriert werden. So kann Prednisolon auch bei CETL-Patienten eingesetzt werden, womit teilweise sogar komplette Remissionen erreicht werden, die jedoch oft nur von kurzer Dauer sind (DE LORIMIER, 2006). Doch auch der palliative Effekt durch eine Verminderung des Pruritus kann den Hunden schon Erleichterung verschaffen (VAIL & YOUNG, 2007). Gerade bei längerer Anwendung von Prednisolon treten häufig Nebenwirkungen wie Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Wesensveränderungen, Lethargie, Hecheln und Verlust der Muskelmasse entsprechend einem iatrogenen Hyperkortisolismus auf (HUANG et al., 1999; CHUN et al., 2007). Kortikosteroide werden in der

Therapie des CETL in der Regel in Kombination mit anderen Zytostatika verwendet (DE LORIMIER, 2006). Von einer längerfristigen Monotherapie mit Prednisolon ist abzuraten, da dies zur Ausbildung einer *multi drug resistance* führen kann (PRICE et al., 1991; KHANNA et al., 1998).

Das aus dem Bakterium *Escherichia coli* gewonnene Enzym L-Asparaginase baut die Aminosäure Asparagin ab und vermindert ihre verfügbare Menge, wodurch die Proteinsynthese wachsender Tumorzellen gehemmt wird (DE LORIMIER, 2006; CHUN et al., 2007). Die Bildung dieser nicht-essentiellen Aminosäure wird durch das Enzym L-Asparagin-Synthetase katalysiert, die in vielen physiologischen Geweben vorhanden ist (DE LORIMIER, 2006), doch auch viele Tumorzellen sind in der Lage die Aktivität dieses Enzyms hochzuregulieren, wodurch sie resistent gegen die Wirkung der L-Asparaginase werden (CHUN et al., 2007). Allerdings exprimieren gerade chemo-naïve lymphatische Tumorzellen dieses Enzym noch nicht und auch unreife Lymphozyten sind nicht fähig Asparagin selbst zu synthetisieren, so dass die L-Asparaginase zur ihrer Apoptose führt (DE LORIMIER, 2006; PIATKOWSKA-JAKUBAS et al., 2008). MORIELLO et al. behandelten 1993 7 Hunde mit pegylierter (PEG-) L-Asparaginase, eine Formulierung des Medikaments, bei der das Enzym in Polyethylenglycol eingekapselt ist, wodurch sie pharmakokinetische Vorteile gegenüber der freien L-Asparaginase hat und seltener zu Nebenwirkungen führt. Bei allen 7 Hunden war eine Verbesserung der klinischen Symptome und der kutanen Läsionen zu verzeichnen, allerdings wurden ausschließlich partielle Remissionen, die oft nur von kurzer Dauer waren, erreicht. Die mediane Überlebenszeit lag in dieser Untersuchung bei 9 Monaten (MORIELLO et al., 1993). Da es sich bei der L-Asparaginase um ein bakterielles Protein handelt, kann es zur Bildung von Antikörpern führen, dadurch steigt mit der Anzahl der Administrationen des Medikaments auch das Risiko anaphylaktischer Reaktionen (DE LORIMIER, 2006; CHUN et al., 2007).

Auch die liposomale Form von Doxorubicin scheint eine gewisse Effektivität bei CETL zu haben. In einer präklinischen Studie behandelten VAIL und Mitarbeiter, unter anderem 9 Hunde mit CETL und erreichten damit eine Remissionsrate von 44 %. Drei Hunde gingen sogar in komplette Remission, wobei diese median nur 90 Tage anhielt, bei einem der Hunde konnte eine partielle Remission verzeichnet werden (VAIL et al., 1997). Eine Nebenwirkung, die in fast 25 % aller

behandelten Hunde auftrat, ist das sogenannte *hand-foot*-Syndrom, auch bekannt als palmar-plantar Erythrodysästhesie (VAIL et al., 1997; VAIL et al., 1998). Typische Symptome dieser Hautreaktion sind Dysästhesien und Parästhesien, Erytheme, Ödeme, Hyperkeratosen, Blasen und Desquamationen (PORTA et al., 2007). Die gleichzeitige Gabe von Pyridoxin (Vitamin B6) kann das Ausreten dieser Nebenwirkung vermindern (VAIL et al., 1998).

Dacarbazine, ein Alkylanz, das DNA in allen Phasen des Zellzyklus alkyliert und quervernetzt, wird in der Humanmedizin vorwiegend zur Behandlung von malignen Melanomen, Hodgkin-Lymphom und verschiedenen Sarkomen verwendet (DE LORIMIER, 2006). In einem Fallbericht von 1997 führte die Therapie mit Dacarbazine zur langfristigen kompletten Remission bei einem Hund mit fortgeschrittenem CETL und Lymphknotenmetastasen (LEMARIÉ & EDDLESTONE, 1997).

Das mit am besten auf seine Effektivität bei CETL untersuchte Zytostatikum ist Lomustin (CCNU). Dieses Alkylanz wird des Öfteren als *rescue*-Medikament bei therapieresistenten Lymphomen eingesetzt (MOORE et al., 1999). In einer Pilotstudie berichten GRAHAM und MYERS unter anderem von 5 Hunden mit CETL, die alle durch die Therapie mit Lomustin in komplette Remission gingen. Zwei der Hunde erhielten das Alkylanz postoperativ und blieben mit 7 und 15 Monaten am längsten in Remission. Insgesamt hielt das Ansprechen bei allen 7 Studien-Hunden, zu denen auch 2 Tiere mit nicht-epitheliotropem kutanem Lymphom zählten, 2 bis 15 Monate an (GRAHAM & MYERS, 1999). WILLIAMS und Kollegen evaluierten 2006 retrospektiv den Krankheitsverlauf von 36 Hunden mit CETL, die CCNU erhalten hatten. Bei 6 Hunden konnte eine komplette Remission erreicht werden, die median 106 Tage anhielt, weitere 17 Hunde blieben für median 88 Tage in partieller Remission (WILLIAMS et al., 2006). Eine weitere retrospektive Analyse, in die 46 Hunde mit CETL eingeschlossen wurden, berichtet von einer Gesamtansprechrate von 83 %. Hier kam es bei 15 Tieren zu kompletter, bei 23 zu partieller Remission, außerdem wurde bei 5 Hunden eine Stagnation des Tumorwachstums erreicht. Die Wirkung hielt hierbei median 94 Tage an. Nur 3 Patienten sprachen nicht auf die Behandlung an (RISBON et al., 2006). Die häufigsten Nebenwirkungen dieses Medikaments resultieren aus der Myelosuppression und in vielen Fällen kommt es zu Neutropenien, Thrombozytopenien und Anämien (MOORE et al., 1999;

HEADING et al., 2011). CCNU ist zudem hepatotoxisch und kann dadurch zu Erhöhung der Alaninaminotransferase (ALT), in schwerwiegenden Fällen sogar zum Leberversagen führen (KRISTAL et al., 2004; HEADING et al., 2011). Auch gastrointestinale Nebenwirkungen, vor allem in Form von Erbrechen sowie eine renale Toxizität sind für Lomustin beschrieben (HEADING et al., 2011).

Kombinations-Chemotherapie-Protokolle werden in der Humanmedizin gerade bei fortgeschrittenen CETL häufiger angewendet, wobei am häufigsten Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP) kombiniert werden. Allerdings scheinen diese Protokolle in Bezug auf Remissionsrate und -zeit keine Vorteile gegenüber Monotherapien zu bringen (WILSON et al., 2001; APISARNTHANARAX et al., 2002; HOPPE et al., 2004; KNOBLER, 2004). DE LORIMIER berichtet, dass am *Departement of Veterinary Clinical Medicine* der *University of Illinois at Urbana-Champaign* mit dem CHOP-Protokoll zum Teil partielle und komplette Remissionen bei einzelnen Hunden mit CETL beobachtet wurden, sogar bei einigen, die nicht auf CCNU angesprochen hatten (DE LORIMIER, 2006). MORGES et al. führten 2014 eine Phase II-Studie durch, bei der sie 10 Hunde mit CETL und 2 mit nicht-epitheliotropen Lymphomen mit VDC-1101, einem azyklischen Nukleotidanalogen behandelten und erreichten eine Ansprechrate von 45 % (MORGES et al., 2014).

Wie bereits weiter oben beschrieben sind Retinoide Vitamin A-Analoga, die Wachstum, Reifung und Ausdifferenzierung vieler physiologischer Zellen beeinflussen (SOUZA & KITCHELL, 2002). Etretnat und Isotretinoin sind synthetische Retenoide, die von WHITE et al. bei verschiedenen kutanen Veränderungen, darunter auch 14 kutanen Lymphomen, angewendet wurden. Dabei erhielten 12 Hunde Isotretinoin und 2 Etretnat. Bei 6 der 14 Patienten wurde ein Ansprechen verzeichnet (WHITE et al., 1993). Der immunhistochemische Nachweis von Retinoidrezeptoren in einer Vielzahl von kutanen T-Zell-Lymphomen gibt ebenfalls Grund zu der Annahme, dass diese Medikamente zur Therapie des CETL geeignet sein könnten (DE MELLO SOUZA et al., 2010). Da Retinoide ein vollkommen anderes Nebenwirkungsspektrum haben als Zytostatika, eignen sie sich sehr gut zur Kombination mit Chemotherapieprotokollen (DE LORIMIER, 2006).

Die Nahrungsergänzung mit essentiellen Fettsäuren, also omega-3- und omega-6-Fettsäuren, scheint ebenfalls einen positiven Effekt auf CETL zu haben. In einer

Studie von IWAMOTO et al. wurde 8 Hunden mit CETL Linoleat, eine 6fach ungesättigte Fettsäure in Form von Färberdistelöl zugefüttert. 6 der 8 Hunde gingen dadurch in Remission (IWAMOTO et al., 1992). Zusätzlich sollten bei Bedarf unterstützende und symptomatische Therapien, wie die antibiotische Versorgung sekundärer bakterieller Infektionen (TSAMBIRAS et al., 2001) und die Anwendung von Analgetika bei dem Verdacht auf Schmerzhaftigkeit durchgeführt werden (HATA et al., 1998; DEVULDER et al., 2001).

2.7. Prognose

Die Prognose für CETL ist als vorsichtig bis schlecht einzustufen und ist abhängig vom jeweiligen Stadium. In der Literatur angegebene mittlere Überlebenszeiten divergieren, mit einigen Monaten und bis zu 2 Jahren, stark (FONTAINE et al., 2009). Die Tiere sterben selten eines natürlichen Todes. Sie werden in den meisten Fällen aufgrund des reduzierten Allgemeinbefindens und der eingeschränkten Lebensqualität durch die Hautveränderungen, aber auch dem damit einhergehenden Pruritus oder aufgrund sekundärer Hautinfektionen mit nachfolgender Septikämie euthanasiert (FONTAINE et al., 2009).

3. Rezeptortyrosinkinasen

Zellwachstum, -differenzierung, -überleben, -stoffwechsel und -tod, aber auch Migration und Zellzykluskontrolle werden in physiologischen Zellen durch Signalkaskaden reguliert, die an der Zelloberfläche beginnen und über das Zytoplasma in den Zellkern übertragen werden. Dabei spielen Rezeptortyrosinkinasen (RTK) eine entscheidende Rolle (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010). Mittlerweile hat man herausgefunden, dass die Tumorgenese unter anderem durch Dysregulationen solcher Signaltransduktionswege, die zum unkontrollierten Zellwachstum führen, bedingt ist. Oft treten diese Veränderungen in gleicher Form in verschiedenen Neoplasien auf, so dass sie als neues Ziel der therapeutischen Intervention immer mehr an Bedeutung gewinnen. Einen ganz entscheidenden Angriffspunkt bilden dabei die

Proteinkinasen, die viele zelluläre Prozesse wie Wachstum und Differenzierung weitreichend kontrollieren. Die Signalübertragung wird durch die Autophosphorylierung dieser Enzyme initiiert (ARGYLE et al., 2004; LONDON, 2009; LONDON, 2014). Sie binden Adenosintriphosphat (ATP) und es kommt zur Bindung des Phosphats an ihre Aminosäurereste. Ausgelöst wird diese Autophosphorylierung in der Regel durch externe Signale, was wiederum zur Übertragung zellulärer Signale führt (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010).

Im menschlichen Genom wurden bereits 90 Tyrosinkinasen nachgewiesen (MANNING et al., 2002), von denen 58 an der Zelloberfläche exprimiert und daher als RTK bezeichnet werden (ARGYLE et al., 2004). Jede RTK ist gleich aufgebaut und unterteilt sich in eine extrazelluläre Domäne, eine transmembranöse Helix und eine zytoplasmatische Region, die aus einer Proteintyrosinkinase und einer regulatorischen juxtamembranen Domäne besteht (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010). Die Bindung der Wachstumsfaktoren an die RTK führt zu einer Dimerisation der in der Regel als Monomer vorliegenden Rezeptoren. Die daraus resultierende Änderung der dreidimensionalen Struktur ermöglicht dann die Bindung von ATP. Die folgende Autophosphorylierung führt dann zu einer Signaltransduktionskaskade unter Beteiligung von Adapterproteinen und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (ARGYLE et al., 2004). Allerdings kann ein Teil der RTK, wie beispielsweise der Insulinrezeptor Oligomere, auch in Abwesenheit eines aktivierenden Ligandens bilden. Trotz alledem führt nur eine Ligandenbindung letztlich zu einer Rezeptoraktivierung (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010).

Im Folgenden soll näher auf die RTK PDGFR, VEGFR und Kit eingegangen werden. Diese 3 RTK gehören zu den sogenannten *split*-Kinasen. Diese Bezeichnung rührt daher, dass in ihrer zytoplasmatischen Domäne, durch einen Einzug der Kinase, die ATP-Bindungstasche von der katalytischen Domäne abgetrennt wird (ARGYLE et al., 2004).

Die physiologische Funktion von PDGFR und VEGFR in der Angiogenese kommt auch Tumoren zugute, da unter anderem mit Hilfe dieser Wachstumsfaktoren die Blutversorgung der Neoplasien sichergestellt und damit auch die Wachstumsgeschwindigkeit beeinflusst wird. Zusätzlich sind die RTK in einer Vielzahl von Tumoren dysreguliert. Diese Fehlfunktionen können durch diverse Mechanismen wie Mutationen, Überexpression, Fusionsproteine oder

autokrine Schleifen verursacht werden (ARGYLE et al., 2004). So hat man *gain of function*-Mutationen von Kit in einer Vielzahl von Neoplasien identifiziert (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010). Oft verändern die Mutationen die Struktur der Proteine so, dass eine Aktivierung ohne Stimulus stattfindet (LONDON, 2014).

3.1. Der *Platelet-derived growth*-Faktor und sein Rezeptor

3.1.1. Aufbau und Expression

Der PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der ursprünglich aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigt wurde (ANTONIADES et al., 1979; HELDIN et al., 1979; RAINES & ROSS, 1982). Zwar sind die α -Granula der Thrombozyten tatsächlich eine wichtige PDGF-Quelle (KAPLAN et al., 1979), doch im Laufe der Zeit haben mehrere Studien gezeigt, dass dieser Polypeptid-Wachstumsfaktor von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert werden kann, darunter auch Fibroblasten, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Endothelzellen und Makrophagen (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Durch externe Stimuli wie Hypoxie (KOUREMBANAS et al., 1997), Thrombin (DANIEL et al., 1986), andere Wachstumsfaktoren und Zytokine wird deren Synthese mit gesteuert (BETSHOLTZ, 1993).

Mittlerweile sind 5 Isoformen des PDGF bekannt, nämlich PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, -DD (HELDIN & WESTERMARK, 1999; LI et al., 2000; BERGSTEN et al., 2001; LI & ERIKSSON, 2003). Es handelt sich immer um Dimere aus Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Die Rezeptoren PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ und PDGFR- $\beta\beta$ sind Tyrosinkinaserzeptoren, die extrazellulär 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen und intrazellulär die Tyrosinkinase-Domäne aufweisen. PDGF bindet an 2 Rezeptoren gleichzeitig, was zur Dimerisation dieser führt, dabei bestehen unterschiedliche Affinitäten zwischen den einzelnen Rezeptor- und Ligandensubtypen. An PDGFR- $\alpha\alpha$ können alle Isoformen binden, ebenso besteht eine Affinität von PDGFR- $\beta\beta$ zu PDGF-BB, -CC und -DD, an PDGFR- $\alpha\beta$ können lediglich PDGF-AB und -BB binden (HELDIN & WESTERMARK, 1999; LI et al., 2000; BERGSTEN et al., 2001; LI & ERIKSSON, 2003). Die PDGF-Rezeptoren sitzen vorwiegend in kleinen Einbuchtungen der Zellmembran, sogenannten Caveolae (LIU et al., 1996). Durch Bindung der Wachstumsfaktoren

kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplex in Endosomen (SORKIN et al., 1991), deren Fusion mit Lysosomen dann zum Abbau des Komplexes führt (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Außerdem werden die Rezeptoren nach Markierung durch Ubiquitinmoleküle, der sogenannten Ubiquitinierung in Proteasomen abgebaut (MORI et al., 1992; MORI et al., 1995). Dieser Prozess ist bei mutierten PDGFR- β gestört und findet nur in verminderter Häufigkeit statt, wodurch sie eine längere Halbwertszeit und einen stärkeren mitogenen Effekt aufweisen als *wild-type*-Rezeptoren (MORI et al., 1993).

3.1.2. Physiologische Funktion

Schon in der embryonalen Entwicklung spielen die PDGFR und ihre Liganden eine entscheidende Rolle. Dies zeigte sich im Laufe der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, als man es schaffte, die Gene der Wachstumsfaktoren sowie der Rezeptoren in Mäusen zu inaktivieren (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Je nachdem welchen Rezeptor oder welchen Wachstumsfaktor man inaktiviert, kommt es zu unterschiedlichen embryonalen Defekten, doch in der Regel sind die Mäuse nicht lebensfähig. So kommt es zur Missbildung der Nieren (LEVEEN et al., 1994; SORIANO, 1994), der Blutgefäße, wie einer dilatierten Aorta (LINDAHL et al., 1997), der Lungenalveolen (BOSTROM et al., 1996), des Myokards sowie des Gehirns. Außerdem zeigen die Knock-out-Mäuse eine ausgeprägte Blutungsneigung zum Zeitpunkt der Geburt, die von der Unfähigkeit der neuen Blutgefäße herrührt, Perizyten zu binden (LINDAHL et al., 1997).

PDGF hat auch einen angiogenetischen Effekt, zwar ist dieser nicht so stark wie der des FGF, doch seine Wichtigkeit in der Blutgefäßbildung scheint auch vom jeweiligen Organ abhängig zu sein (HELDIN & WESTERMARK, 1999). In der kardialen Angiogenese spielt er beispielsweise eine entscheidende Rolle (EDELBERG et al., 1998; PRICE et al., 2003). Auch an der Regulation des Blutgefäßtonus ist PDGF beteiligt. Er führt einerseits zur Vasokonstriktionen in einer Vielzahl von Blutgefäßen (BERK et al., 1986; SACHINIDIS et al., 1990) und andererseits wurde bei Ratten eine PDGF-medierte Relaxation der Aorta beobachtet (CUNNINGHAM et al., 1992). Thrombozyten sowie ihre Vorläufer die Megakaryozyten, aber auch Endothelzellen von Kapillaren exprimieren PDGFR. Dadurch hat der PDGF, der selbst in großen Mengen von den Thrombozyten synthetisiert wird einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Dabei handelt

es sich um einen autokrinen *feedback*-Mechanismus (VASSBOTN et al., 1994; SELHEIM et al., 2000).

Zum adäquaten Austausch von Flüssigkeit und Makromolekülen zwischen extrazellulärem Raum und Gefäßsystem ist ein negativer Druck im interstitiellen Gewebe unabdingbar und auch hier hat der PDGF einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks im Interstitium (RODT et al., 1996). Des Weiteren spielt der PDGF eine entscheidende Rolle in der Wundheilung, da er an mehreren, an diesem Prozess beteiligten Zellen wirken kann. So werden Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur zur Mitose und Chemotaxis angeregt. Zusätzlich stimuliert er die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen. Er ruft die Freisetzung weiterer wichtiger Wachstumsfaktoren durch Makrophagen hervor und induziert die Produktion verschiedener Matrixmoleküle wie Fibronectin, Kollagen, Proteoglykane und Hyaluronsäure. Auch im späteren Verlauf des Wundheilungsprozesses ist der PDGF von Wichtigkeit, da er die Wundkontraktion und die Produktion und Sekretion von Kollagenasen durch Fibroblasten in der Regenerationsphase stimuliert. Ermöglicht wird dies durch die Freisetzung von PDGF aus Thrombozyten sowie die Sekretion durch Makrophagen, Thrombin-stimulierte Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur beschädigter Blutgefäße, aktivierten Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten. Er kann ebenfalls in der Wundflüssigkeit von Weichteilgeweben und der Tränenflüssigkeit im Rahmen von Wundheilungsprozessen der Kornea nachgewiesen werden. Zur Entfaltung ihrer Wirkung müssen PDGFR exprimiert werden, diese Expression wird in einer Vielzahl von Zellen in verwundeten Bereichen hochreguliert (HELDIN & WESTERMARK, 1999). In der Humanmedizin macht man sich diese Effekte bereits zunutze und setzt eine rekombinante Form des PDGF (Becaplermin) erfolgreich in der Behandlung von Ulzerationen der unteren Extremitäten bei Diabetikern ein (EMBIL & NAGAI, 2002).

3.1.3. Die Rolle von Rezeptor und Ligand in der Onkogenese

Bereits Anfang der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts fand man in mehreren Studien heraus, dass die B-Kette des PDGF in ihrer Struktur mit dem *sis*-Protoonkogen identisch ist (ABADIE et al., 2009), woraus man den Schluss zog, dass eine Überfunktion des PDGF oder seines Rezeptors zur malignen Transformation von Zellen führen kann (DOOLITTLE et al., 1983;

WATERFIELD et al., 1983). C-*sis* führt über autokrine Mechanismen zur Transformation, wenn Zellen PDGFR exprimieren (LEAL et al., 1985; BECKMANN et al., 1988). Es wird neuer PDGF gebildet, der schon im endoplasmatischen Retikulum an den unreifen Rezeptor bindet und so zu seiner Autophosphorylierung führt (KEATING & WILLIAMS, 1988; FLEMING et al., 1989). In ersten tierexperimentellen Untersuchungen fand man heraus, dass die Infektion mit Retroviren, die die B-Kette des PDGF enthalten, Fibrosarkome und Gliome in Mäusen hervorrufen kann (PECH et al., 1989; UHRBOM et al., 1998). Aufgrund dieser experimentell nachgewiesenen in vitro und in vivo Transformation und Tumorgenese wurde eine Vielzahl an Neoplasien, unter anderem Glioblastome, Weichteilsarkome, Dermatofibrosarcoma protuberans, Melanome sowie verschiedene Karzinome und Leukämien auf die Expression von PDGF und seinem Rezeptor untersucht und nachgewiesen. Allerdings war bei der Mehrheit dieser Tumoren der Status der PDGF- und PDGFR-Expression des physiologischen Gewebes aus dem die Neoplasien entstanden sind, nicht bekannt, so dass die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind (HELDIN & WESTERMARK, 1999).

Mittlerweile weiß man, dass beispielsweise in Dermatofibrosarkoma protuberans und seiner juvenilen Form, dem Riesenzellfibroblastom, die Fusion des Kollagen-Gens COL1A1 mit der PDGF-B-Kette zu einer Hochregulation der PDGF-B-Expression und damit zur permanenten autokrinen Aktivierung des PDGFR führt, woraus mitotische Signale resultieren (SIMON et al., 1997; SHIMIZU et al., 1999). Auch in verschiedenen Gehirntumoren, am häufigsten in Tumoren mit Gliazellen als Ursprungsgewebe, aber auch in primitiven neuroektodermalen Neoplasien konnten eine Amplifikation und Mutationen des PDGFR- α -Gens nachgewiesen werden, die zu einer Überexpression dieses Rezeptors führen (FLEMING et al., 1992; SMITS & FUNA, 1998; SMITH et al., 2000; MARTINHO et al., 2009; BLOM et al., 2010; CALZOLARI & MALATESTA, 2010). Außerdem spielen der PDGF-B und der β -Rezeptor wohl auch eine Rolle bei verschiedenen Leukämieformen (FOSS et al., 2001; HO et al., 2005; YANG et al., 2010). Des Weiteren wird PDGF eine tragende Rolle in der Entwicklung der Myelofibrose bei chronischer myeloischer Leukämie zugeschrieben (KIMURA et al., 1995). In einer neueren Studie untersuchten MUEHLING und Kollegen Lungenmetastasen einer Reihe von Tumoren, darunter Nierenzellkarzinome,

Sarkome, Kolonkarzinome und Melanome auf ihre Expression von Wachstumsfaktoren. Dabei exprimierten alle Metastasen PDGF- α und 69 % auch auf PDGFR- β , weitaus weniger Tochtergeschwülste zeigten eine Expression von VEGFR und EGFR (MUEHLING et al., 2010). Auch in Ovarialtumoren hat PDGF, über die autokrine Stimulation Einfluss auf das Tumorwachstum und seine Expression korreliert negativ mit der Überlebenszeit (HENRIKSEN et al., 1993; MATEI et al., 2004; MATEI et al., 2006). Bereits 1984 wiesen BETSHOLTZ et al. PDGF und seinen Rezeptor in humanen Osteosarkom-Zelllinien nach (BETSHOLTZ et al., 1984). Auch in caninen Osteosarkomen konnte die Co-Expression des Wachstumsfaktors und seines Rezeptors nachgewiesen werden (MANISCALCO et al., 2013). Neben seiner autokrinen Funktion ist der PDGF auch an der parakrinen Stimulation von Stromazellen beteiligt, zum Beispiel in Mammakarzinomen (ANAN et al., 1996; BHARDWAJ et al., 1996; YOKOYAMA et al., 2011), kolorektalen Neoplasien (SUNDBERG et al., 1997) und kleinzelligen Lungenkarzinomen (KAWAI et al., 1997; KANAZAWA et al., 2010). Diese parakrine Stimulation wurde auch in malignen Melanomen nachgewiesen, hier konnte gezeigt werden, dass Tumoren von Zelllinien mit PDGF-Expression größer wurden und auch schneller an Volumen zunahmen als die Kontrolltumoren (FURUHASHI et al., 2004). Außerdem scheint PDGF auch einen Einfluss auf die Tumormorphologie zu haben, denn in der Studie von FORSBERG und Mitarbeitern zeigten sich Tumoren mit PDGF-Expression reich an Stroma, gut vaskularisiert und ohne Anzeichen von Nekrose. Die Tumoren der Kontrollgruppe hingegen wiesen Nekrosezonen auf, waren nur schlecht mit Blutgefäßen versorgt und es fand sich kein Stroma (FORSBERG et al., 1993). Mittlerweile konnte man nachweisen, dass PDGF-BB zur Expression von Erythropoetin mRNA und -Proteinen führt, was dann in einer Förderung des Tumorwachstums resultiert (XUE et al., 2012).

3.2. Der *Vascular endothelial growth*-Faktor und sein Rezeptor

3.2.1. Aufbau und Expression

Die VEGF-Familie besteht aus 5 Mitgliedern, dem VEGF-A, -B, -C und -D, sowie dem *placental growth factor* (PlGF). Ist von VEGF die Rede so handelt es sich meist um VEGF-A, da dieser eine Schlüsselrolle in der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Differenzierung endothelialer Progenitorzellen spielt

(TAKAHASHI, 2011).

Die VEGFR unterteilen sich wiederum in 3 Subtypen: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, die den PDGFR strukturell sehr ähnlich sind (TAKAHASHI, 2011). Wie eigentlich alle Tyrosinkinase setzen sich auch die VEGFR aus 3 Bereichen zusammen, der extrazellulären *domaine*, bestehend aus 7 immunglobulin-ähnlichen Domänen, der transmembranösen *domaine* sowie der intrazellulären Tyrosinkinase, wobei jeder Rezeptor individuelle Besonderheiten in seiner Struktur aufweist (SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006; TAKAHASHI, 2011). Synonym kann VEGFR-1 auch *fms-like-Tyrosinkinase-1* (Flt-1), VEGFR-2 als *fatal liver kinase-1* (Flk-1) oder *kinase domaine region* (KDR) bezeichnet werden und Flt-4 ist ein Synonym für VEGFR-3 (MÜLLER-DEILE et al., 2009). VEGFR-1 und -2 werden von Gefäßendothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. VEGFR-1 wird zusätzlich auch von Monozyten und Makrophagen, dendritischen Zellen, Osteoklasten, Perizyten, Podozyten und Trophoblasten der Plazenta exprimiert (KAIPAINEN et al., 1993; NOMURA et al., 1995; BARLEON et al., 1996; CLAUSSE et al., 1996; SAWANO et al., 2001; DIKOV et al., 2005; MÜLLER-DEILE et al., 2009). Der *kinase insert domaine*-Rezeptor (KDR) oder VEGFR-2 scheint eine wichtige Rolle in der frühen Embryogenese zu spielen, da er in dieser Phase von endothelialen Vorläuferzellen exprimiert wird. Danach zeigen Endothelzellen nur noch eine reduzierte Expression von VEGFR-2, die bei pathologischen Zuständen, wie etwa der Angiogenese von Tumoren wieder gesteigert wird. Des Weiteren werden VEGFR auch von nicht-endothelialen Zellen wie Osteoblasten, neuronalen Zellen, kardialen Myozyten, Myofibroblasten, Zellen des Ductus pancreaticus, Retinavorläuferzellen und Megakaryozyten exprimiert (MATSUMOTO & CLAEISSON-WELSH, 2001; SABAN, 2015). Dahingegen wird VEGFR-3 fast ausschließlich von lymphatischen Endothelzellen exprimiert, doch auch in den gefensterten Kapillaren und Venen endokriner Organe und in Monozyten und Makrophagen konnte seine Expression nachgewiesen werden (VEIKKOLA et al., 2001; ALITALO & CARMELIET, 2002; SAHARINEN et al., 2004). Die verschiedenen VEGFR-Liganden binden mit unterschiedlicher Affinität an die jeweiligen Rezeptoren-Subtypen. VEGF-A bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2, weist jedoch eine zehnfach höhere Affinität zu VEGFR-1 auf. Allerdings wird seine Tyrosinkinase trotzdem nur sehr schwach durch VEGF-A aktiviert

(SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006; TAKAHASHI, 2011). VEGF-B und PIGF aktivieren ausschließlich VEGFR-1. VEGF-C, sowie VEGF-D repräsentieren spezifische Liganden für VEGFR-3. Sind Letztere jedoch proteolytisch verändert, so können sie zusätzlich auch an VEGFR-2 binden (JOUKOV et al., 1996; TAKAHASHI, 2011).

3.2.2. Physiologische Funktion

Wie *in vitro* festgestellt werden konnte, übertragen die 3 VEGFR, wie viele andere Wachstumsfaktorrezeptoren, Signale für Zellüberleben, -proliferation und -migration. 1995 zeigten FONG und Mitarbeiter, dass Mäuse ohne VEGFR-1 an Tag 8 bis 9 der embryonalen Entwicklung aufgrund von Überwucherung endothelialer Zellen und Desorganisation der Blutgefäße sterben (FONG et al., 1995). Womit der Verdacht nahe liegt, dass VEGFR-1 einen wichtigen negativen Regulator der embryonalen Vaskulogenese darstellt. Es wird vermutet, dass der Rezeptor VEGF-A bindet und dadurch eine Aktivierung von VEGFR-2 verhindert (HIRATSUKA et al., 1998). Des Weiteren überträgt Flt-1 schwache Signale zum Wachstum und Überleben von Perizyten und Endothelzellen sowie Makrophagenmigration (BARLEON et al., 1996; CLAUSS et al., 1996; YAMAGISHI et al., 1999; LYDEN et al., 2001; SAWANO et al., 2001). Die Stimulation des Überlebens und des Wachstums von Gefäßendothelzellen sowie die Promotion der Angiogenese sind mit die wichtigsten Funktionen des VEGFR-2 (SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006). Mäuse, denen der Flk-1 fehlt, versterben noch in der embryonalen Phase, da ihnen organisierte Blutgefäße fehlen und die Zahl der hämatopoetischen Vorläuferzellen stark reduziert ist (SHALABY et al., 1995). Dies zeigt, dass die adäquate embryonale Gefäßentwicklung nur durch die exakte Balance aus VEGFR-1 und VEGFR-2 gewährleistet wird (SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006). Sowohl in der Embryogenese als auch beim erwachsenen Individuum führt die VEGFR-2-Aktivierung zur Stimulation der Migration und des Wachstums von Endothelzellen, fördert ihre tubuläre Formation und erhöht die Gefäßpermeabilität (SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006; TAKAHASHI, 2011). Des Weiteren ist VEGFR-2 an der Entwicklung der Retina beteiligt (GERHARDT et al., 2003). Während der Embryogenese ist auch VEGFR-3 an der Bildung von Blutgefäßen beteiligt. Dies wird dadurch deutlich, dass die Inaktivierung des VEGFR-3-Gens zu abnormaler Umformung des primären Gefäßplexus und damit zum Tod des

Embryos führt (DUMONT et al., 1998). Später beschränkt sich die Expression des Rezeptors fast ausschließlich auf lymphatisches Endothel (OLIVER & DETMAR, 2002). VEGFR-3 ist im Zusammenspiel mit VEGF-C essentiell für die Sprossung von Lymphgefäßen, ein Fehlen dieser Interaktion führt zum pränatalen Tod durch Ödematisierung der Gewebe (KARKKAINEN et al., 2004). Eine Hemmung von VEGF-C und VEGF-D führt zur Regression bereits gebildeter Lymphgefäße in Mäuseembryonen, während Blutgefäße unverändert bleiben. Die Mäuse entwickeln typische Veränderungen in Form von geschwollenen Pfoten, Ödemen und dermalen Fibrose. Sie können jedoch die neonatale Phase überleben, obwohl in einigen Organen eine Versorgung mit lymphatischen Gefäßen vollkommen fehlt (MAKINEN et al., 2001).

3.2.3. Rolle von Rezeptor und Liganden in der Onkogenese

Die Angiogenese ist ein Schlüsselereignis in der Karzinogenese, was auch daran zu erkennen ist, dass Hyperplasien in der Regel ohne neu formierte Blutgefäße ent- und bestehen können (FOLKMAN et al., 1989). Gerade in soliden Tumoren muss die Versorgung des neoplastischen Gewebes mit Nährstoffen durch ein neugebildetes Blutgefäßsystem gewährleistet werden (FOLKMAN, 1992; HANAHAN & FOLKMAN, 1996). Neoplasien, die größer als ein Kubikmillimeter werden, sind auf neue Gefäße angewiesen (ESKENS, 2004). Dieser Wechsel von einer anfangs avaskulären Umfangsvermehrung zu einem schnell wachsenden, intensiv vaskularisierten Tumor ist ein entscheidender Schritt in der Entstehung von Neoplasien (HANAHAN & WEINBERG, 2011). VEGFR-1 beeinflusst die pathologische Vaskularisierung direkt durch die Stimulation der Endothelzellfunktion und indirekt durch die Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (CARMELIET et al., 2001; HATTORI et al., 2002). Werden VEGFR-1-spezifische Liganden im Rahmen der Tumorangio-genese vermehrt exprimiert, so fungiert der Rezeptor als positiver Regulator der Blutgefäßbildung (HIRATSUKA et al., 2001). Durch die Induktion der MMP9 in der Lunge steigert der VEGFR-1 die Metastasierung von Tumoren in dieses Organ (HIRATSUKA et al., 2002). Die Bedeutung von VEGF-C und VEGF-D für das Metastasierungsverhalten verschiedener Tumoren wurde zuerst an Tumorzelllinien und Mausmodellen deutlich. Hier zeigte sich, dass beispielsweise Mammatumoren, die VEGF-C exprimierten in die regionären Lymphknoten und die Lunge metastasieren, solche ohne VEGF-C-Expression

nicht (SKOBE et al., 2001b). Ähnliches wurde auch in Tumoren der β -Zellen des Pankreas nachgewiesen (MANDRIOTA et al., 2001). SKOBE und Mitarbeiter konnten aufzeigen, dass VEGF-C in Melanomen sowohl die Lymphangiogenese als auch die Angiogenese beeinflusst (SKOBE et al., 2001a). Eine Vielzahl an humanmedizinischen Studien untersuchte ein breites Spektrum an Karzinomen und Melanomen unterschiedlicher Ursprungszellen auf ihre Expression von VEGF-C und VEGF-D und deren Einfluss auf das biologische Verhalten. STACKER und Kollegen fassten die Ergebnisse in ihrer Studie 2004 zusammen. Es stellte sich heraus, dass in fast 80 % der Untersuchungen die Expression eines oder beider dieser Wachstumsfaktoren mit klinisch-pathologischen Parametern, die die Prognose beeinflussen, korrelierte (STACKER et al., 2004). Ihrer Übersicht ist zu entnehmen, dass die Faktoren Lymphknotenmetastasen, Tumorinvasivität, histologischer Grad, krankheitsfreie und Überlebenszeit bei Karzinomen der Schilddrüse, des Magens, des Pankreas, der Prostata, der Gallenblase, der Lunge, des Uterus und der Ovarien, des Ösophagus und der Mamma sowie bei kolorektalen Karzinomen und Melanomen häufig beeinflussen, allerdings, je nach Tumorart, in unterschiedlichem Maße (STACKER et al., 2004). Auch in Sarkomen sind VEGF und VEGFR entscheidend für die Tumorprogression und die Prognose (KILVAER et al., 2010). CHAO und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die VEGF-Expression von Weichteilsarkomen mit dem histologischen Grad korreliert (CHAO et al., 2001). Auch DUBOIS und DEMETRI bewiesen in ihrer Studie, dass angiogenetische Faktoren, wie VEGF mit einer Vielzahl an klinischen Eigenschaften von Sarkomen im Zusammenhang stehen (DUBOIS & DEMETRI, 2007). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch YOON und Kollegen, sie kamen zu dem Schluss, dass die Menge an angiogenetischen Faktoren in Weichteilsarkomen mit dem Ausmaß der Erkrankung und der Rezidivierung korreliert (YOON et al., 2004).

Auch in caninen Tumoren wurde die VEGF-Expression bereits untersucht. So wiesen RAWLINGS et al. VEGFR-2 in kutanen und oralen Melanomen von Hunden nach (RAWLINGS et al., 2003). Im gleichen Jahr zeigten RESTUCCI und Kollegen, dass die VEGF-Expression in Seminomen mit der intrinsischen Malignität und dem Wachstumspotenzial in Zusammenhang steht (RESTUCCI et al., 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch eine Expression von VEGF in caninen Mammatumoren nachweisen sowie, dass VEGF-2 in schlecht

differenzierten Tumoren mehr exprimiert wird als in gut differenzierten (RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2004). MILLANTA und Mitarbeiter konnten allerdings keine Korrelation zwischen der Expression von VEGF und VEGFR-2 und sämtlichen klinisch-pathologischen Parametern oder der Prognose von felines und caninen Mammatumoren feststellen (MILLANTA et al., 2006). Es besteht ebenfalls eine Korrelation zwischen VEGF beziehungsweise VEGFR-2 und dem histologischen Grad sowie dem Proliferationsindex und der Dichte an Mikrogefäßen in Plattenepithelkarzinomen (AL-DISSI et al., 2007). Auch diese Arbeitsgruppe forschte weiter auf diesem Gebiet und konnte 2009 in 22 caninen Fibrosarkomen eine VEGF- und VEGFR-2-Expression nachweisen (AL-DISSI et al., 2009). WERGIN und KASER-HOTZ untersuchten die Plasmakonzentration von VEGF bei Hunden mit unterschiedlichen Tumoren, darunter 42 Weichteil- oder Osteosarkome, 14 Karzinome und 6 orale Melanome. Dabei stellte sich heraus, dass bei Hunden mit aggressiveren Tumoren auch höhere VEGF-Konzentrationen im Blut nachweisbar sind (WERGIN & KASER-HOTZ, 2004). Auch bei caninen Mastzelltumoren konnte gezeigt werden, dass ein höheres VEGF-Level mit Grad 2- und 3-Tumoren assoziiert ist (PATRUNO et al., 2009). Eine ähnliche Korrelation besteht zwischen der Überexpression von VEGF und der Malignität von caninen Lymphomen (ZIZZO et al., 2010).

3.3. Kit und sein Ligand Stammzellfaktor

3.3.1. Aufbau und Expression

1986 identifizierten BESMER und Kollegen das vom Hardy-Zuckerman-4-felines-Sarkomvirus exprimierte virale Onkogen und nannten den onkogenen Transformationsfaktor v-Kit (BESMER et al., 1986). Die Sequenz des zellulären homologen Pendant Kit wurde dann von YARDEN und Mitarbeitern hergeleitet (YARDEN et al., 1987). Einige Jahre später wurde der Ligand des Rezeptors geklont und als ein vom SI-Locus des Mäusechromosoms kodiertes Protein charakterisiert (COPELAND et al., 1990; WILLIAMS et al., 1990; ZSEBO et al., 1990). Es gab allerdings noch keine einheitliche Bezeichnung für den Bindungspartner des Rezeptors, so dass er als Kit-Ligand (HUANG et al., 1990), *mast cell growth factor* (COPELAND et al., 1990), *steel factor* (WITTE, 1990) oder auch Stammzellfaktor (SCF) (ZSEBO et al., 1990) deklariert wurde. Kit gehört ebenso wie die beiden bereits beschriebenen PDGFR und VEGFR zu

den Typ-III-Rezeptor-TKI und weist daher viele strukturelle Ähnlichkeiten mit diesen auf (ROSKOSKI, 2005a). Auch Kit ist unterteilt in eine extrazelluläre Domäne, an die der Ligand bindet, ein transmembranäres Segment und die zytoplasmatische Tyrosinkinase. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Segmenten, wobei der SCF an die zweite und dritte bindet, die vierte ist essentiell für die Dimerisation des Rezeptors (TAYLOR & METCALFE, 2000). Die intrazelluläre Domäne wird durch eine hydrophile Kinasesequenz in eine ATP-Bindungs- und eine Phosphotransferase-Region unterteilt, weswegen Kit auch als Splitkinase bezeichnet werden kann (YARDEN et al., 1987). Beim Menschen wurden bisher 4 Isoformen des Stammzellfaktor-Rezeptors identifiziert (ROSKOSKI, 2005a). Da er mit einer Reihe von Enzymen und Adapterproteinen interagiert, ist Kit an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen und somit an einer Reihe wichtiger Mechanismen wie dem Überleben, aber auch der Apoptose verschiedener Zellen beteiligt (ROSKOSKI, 2005b). Kit wird von hämatopoetischen Stammzellen, dendritischen, erythroiden, megakaryozytären und myeloischen Vorläuferzellen sowie pro-B-Zellen und pro-T-Zellen exprimiert (LYMAN & JACOBSEN, 1998). Im Laufe der Ausdifferenzierung verlieren die meisten Zellen die Möglichkeit der Kit-Expression, nur ausgereifte Mastzellen, Melanozyten und die intestinalen Kajal-Zellen exprimieren den Rezeptor weiterhin (ROSKOSKI, 2005a).

Der SCF erhielt seinen Namen aufgrund seiner Beteiligung am Überleben, der Selbsterneuerung und der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (ROSKOSKI, 2005a). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass Kit und das funktionelle Protein bereits von pluripotenten Stammzellen exprimiert werden (PALMQVIST et al., 2005). SCF existiert sowohl in einer membran-gebundenen als auch einer löslichen Form, beide bestehen aus einem extrazellulären Anteil, einem transmembranären Segment, sowie einer intrazellulären Domäne (ZHANG et al., 2000). Die Freisetzung von Isoform 1, dem löslichen Faktor, wird vor allem durch die MMP9 katalysiert. Der SCF agiert als nicht-kovalentes Homodimer (HEISSIG et al., 2002). Während der Embryogenese wird er in einer großen Zahl von Zellen und Organen exprimiert. In dieser Phase kann er in Gehirn, Herz, Lungen, Nieren, Endothelium, Gameten, Melanozyten und der Haut nachgewiesen werden, des Weiteren auch in den Stromalzellen des

Knochenmarks, der Leber und des Thymus (GALLI et al., 1994). SCF wirkt synergistisch zu hämatopoetischen Kolonie-stimulierenden Faktoren wie dem GM-CSF, IL-3 und Erythropoetin (LENNARTSSON et al., 2005).

3.3.2. Physiologische Funktion

Die Signaltransduktion via Kit und SCF ist entscheidend in der Erythropoese, der Lymphopoese, der Entwicklung und Funktion von Mastzellen, der Megakaryopoese, der Gametogenese, sowie der Melanogenese (RÖNNSTRAND, 2004). Hämatopoetische Stammzellen weisen eine starke c-Kit-Expression auf, allerdings geht diese bei den meisten Zellen im Laufe ihrer Entwicklung langsam verloren. Lediglich Mastzellen, natürliche Killerzellen und einige dendritische Zellen behalten die Expression des Rezeptors bei (ORISS et al., 2014). Etwa ein bis 4 % der myeloischen Stammzellen exprimieren bei gesunden, adulten Menschen c-Kit (LIANG et al., 2013). Welchen Einfluss der Wachstumsfaktor und sein Rezeptor auf die unterschiedlichen physiologischen Funktionen verschiedener Organe und Zellen haben, wird erst deutlich, wenn Mutationen am SI-Locus, der für den SCF kodiert oder am W-Locus, der für Kit kodiert, vorliegen. Fehlt SCF oder Kit führt dies bei Mäusen zum intrauterinen oder perinatalen Tod aufgrund einer schwerwiegenden makrozytären Anämie. Eine eingeschränkte Funktion des Kit-Rezeptors oder veränderte SCF-Produktion, jeweils hervorgerufen durch Punktmutationen, rufen eine Vielzahl an phänotypischen Anomalien wie einer verminderten Anzahl an Gewebsmastzellen, eine Beeinträchtigung der Fertilität und Hypopigmentation hervor (BROUDY, 1997). Dabei spiegelt der Schweregrad der phänotypischen Veränderungen auch das Ausmaß der Kit-Defekte wider (REITH et al., 1990). Des Weiteren zeigten MOTRO und Kollegen an einem Mausmodell, dass Mutationen in einem oder beiden Loci zu einer verringerten Lernfähigkeit und Gedächtnisleistung sowie einer gestörten Regeneration peripherer Nerven führt (MOTRO et al., 1996). Die Untersuchungen von KIMURA und Mitarbeitern zeigten, dass Mäuse mit Kit-Mutationen Splenomegalien aufweisen, die durch eine ungewöhnlich hohe Zahl an B-Zellen und Megakaryozyten in der Milz verursacht werden. Außerdem zeigten die Mäuse in dieser Studie zum Teil fehlerhafte Differenzierungen von prä-B-Zellen zu unreifen B-Zellen, so dass vermutet werden kann, dass der Kit-Signaltransduktionsweg auch hier eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren wiesen die Versuchstiere mit Kit-Mutationen Erweiterungen des Gastrointestinaltraktes

auf, wobei weder myoenterische Ganglienzellen noch die Zellorganisation der Organe histologisch verändert waren. Zusätzlich deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass Kit die Migration von Mastzellen beeinflusst, da in Tieren mit Kit-Mutation die Anzahl der Mastzellen in der Dermis des Schwanzes, der Peritonealhöhle und dem Magen im Gegensatz zu Tieren mit physiologischem Kit stark vermindert oder die Zellen gar nicht vorhanden waren (KIMURA et al., 2004). Wird die Kit/SCF-Signaltransduktion gehemmt, führt dies zu einem signifikanten Absinken des Histaminspiegels, auch die Infiltration durch Mastzellen und eosinophile Granulozyten nimmt ab und Hyperreagibilität des Respirationstrakts wird vermindert (REBER et al., 2006). Kit gewährleistet das Überleben und die Proliferation primordialer Keimzellen und spielt auch postnatal eine wichtige Rolle in der Spermatogenese, da es von Spermatogonien exprimiert wird (ROSSI, 2013).

3.3.3. Die Rolle von Kit und seinem Liganden in der Onkogenese

In der Humanmedizin wurden Kit-Mutationen bereits in einer Vielzahl von Neoplasien nachgewiesen. So können bei bis zu 90 % aller Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), bei über 70 % aller Mastozytome, 17 % der sinonasalen T-Zell-Lymphome und 9 % der Seminome und Dysgerminome, sowie vereinzelt auch bei akuten myeloischen Leukämien *gain-of-function*-Mutationen festgestellt werden (HEINRICH et al., 2002). NAGATA und Mitarbeiter zeigten bereits 1995, dass Punktmutationen in c-Kit für eine bestimmte Form der humanen Mastozytose spezifisch sind, die mit hämatologischen Störungen assoziiert ist. Dabei entwickeln die Patienten zusätzlich zu den klassischen Mastzellläsionen myelodysplastische Syndrome, myeloproliferative Störungen, akute nicht-lymphatische Leukämien oder chronische Neutropenien (NAGATA et al., 1995). Drei Jahre später wiesen HIROTA und Kollegen Mutationen vor allem in der transmembranären Domäne des Kit-Rezeptors nach, die zu Liganden-unabhängigen Aktivierungen führen (HIROTA et al., 1998). Es kommt hierbei zu Deletionen, Insertionen und Substitutionen (CORLESS et al., 2004). Wobei gerade Deletionen bei GIST mit einer kürzeren progressionsfreien Zeit, Metastasierung sowie einer geringeren Überlebenszeit assoziiert sind (ERNST et al., 1998; LASOTA et al., 1999; TANIGUCHI et al., 1999; SINGER et al., 2002; LIU et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; CHO et al., 2006). PINTO et al. konnten keine Expression von c-Kit in non-Hodgkin Lymphomen, aber in Zellen

der Hodgkin-Krankheit sowie, in noch stärkerem Ausmaß in anaplastischen großzelligen Lymphomen feststellen (PINTO et al., 1994). Auch in über 80 % primärer Mammakarzinome kann eine Kit-Expression nachgewiesen werden, dies führt wahrscheinlich zu autokriner Wachstumsstimulation in diesen Tumoren (HINES et al., 1995). Eine Co-Expression von Kit und SCF wurde auch bei kleinzelligen Lungenkarzinomen nachgewiesen, was auch hier eine autokrine Stimulation des Tumorwachstums vermuten lässt (KRYSTAL et al., 1996). INOUE und Kollegen untersuchten gynäkologische Tumorzelllinien und konnten zeigen, dass SCF von mehreren Neoplasien der Zervix, der Vulva und des Endometriums exprimiert wird. Kit wurde allerdings nur in 2 der 16 analysierten Zelllinien nachgewiesen, in diesen wurde die SCF-Koexpression bestätigt, was auch hier auf eine autokrine Wachstumsregulation hindeuten könnte (INOUE et al., 1994). Im Gegensatz dazu nimmt im Laufe der Tumorprogression von humanen malignen Melanomen die Kit-Expression ab. In bis zu 70 % aller Melanommetastasen und Melanomzelllinien ist keinerlei Expression des Rezeptors mehr detektierbar (LASSAM & BICKFORD, 1992; ZAKUT et al., 1993; NATALI et al., 1994). HUANG und Mitarbeiter konnten sogar anhand eines Nacktmaus-Modells zeigen, dass c-Kit-positive subkutane Melanome signifikant langsamer wachsen und es seltener zu Lungenmetastasen kommt als in c-Kit-negativen Tumoren. Außerdem bewiesen sie, dass SCF bei c-Kit-exprimierenden Melanomzellen zur Apoptose führt (HUANG et al., 1996).

In der Veterinärmedizin ist der Mastzelltumor der wohl am besten auf Kit-Mutationen hin untersuchte Tumor. Eine Reihe von Autoren konnte zeigen, dass circa 30 % aller caninen Mastzelltumoren Kit-Mutationen aufweisen, die zu unkontrollierter Signaltransduktion führen. Es handelt sich dabei vorwiegend um interne Tandemdublikationen in der juxtamembranären Domäne, doch auch *gain-of-function*-Mutationen im extrazellulären Anteil des Rezeptors können in einigen Tumoren nachgewiesen werden. Sie sind in der Regel mit einem höheren Tumorigrad und somit auch mit einer höheren Rezidivrate und einer verminderten Überlebenszeit assoziiert (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999; ZEMKE et al., 2001; DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002; LETARD et al., 2008). Auch in 67,7 %, beziehungsweise 62,5 % der felines Mastzelltumoren konnten bereits c-Kit-Mutationen nachgewiesen werden, die wahrscheinlich einen unkontrollierten Wachstumsstimulus verursachen (ISOTANI et al., 2006;

SABATTINI et al., 2013). In der bereits früher in dieser Arbeit erwähnten Studie von SMITH und Kollegen zeigte auch ein Viertel der untersuchten feline Sarkome eine Immunreaktivität für Kit, allerdings konnten die Autoren keine Korrelation zwischen der Expression des Rezeptors und dem histologischen Grad oder dem Zellüberleben feststellen (SMITH et al., 2009). In den Untersuchungen von DALY und Kollegen wurde in beiden analysierten FISS-Zelllinien eine c-Kit-Expression nachgewiesen (DALY et al., 2009). Eine Evaluierung von caninen Hämangiosarkomen der Milz im Vergleich zu physiologischem Milzgewebe zeigte bei 40 % der untersuchten Hämangiosarkome eine Expression von Kit, während der Rezeptor nicht im unveränderten Gewebe nachgewiesen werden konnte. Allerdings untersuchte die Arbeitsgruppe 10 Hämangiosarkome und nur 2 physiologische Organe (ADACHI et al., 2015). TAKANOSU et al. analysierten canine GIST hinsichtlich c-Kit-Mutationen und konnten eruieren, dass wie beim Menschen auch, die Mutationen vorwiegend im Exon 11 auftreten, wobei kein Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und Expressionsmuster zu bestehen scheint (TAKANOSU et al., 2016). Die Analyse caniner Mammakarzinome zeigte, dass eine starke Expression von c-Kit mit einer schlechten Prognose korreliert. Die Expression des Rezeptors wurde vorwiegend im Zytoplasma gesehen, wobei das adnexale gesunde Mammagewebe c-Kit ebenfalls, aber in geringerem Maße als die Tumorzellen, exprimierte (CARVALHO et al., 2015).

4. Tyrosinkinase-Inhibitoren

4.1. Allgemeines

Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) oder genauer *small molecule tyrosine kinase inhibitors* sind eine in der Tiermedizin relative neue Medikamentengruppe und gehören, wie zum Beispiel Gentherapie und RNA-Interferenz zur *molecular target therapy*. Ihre Wirkungsweise ist immer gleich. Sie hemmen kompetitiv die Bindung von ATP an die Rezeptorkinase, die sich dadurch nicht mehr selbst phosphorylieren kann. Dadurch kann kein *downstream*-Signal generiert und gesendet werden (ARGYLE et al., 2004). Die verschiedenen human- und veterinärmedizinischen TKI haben alle ein bestimmtes Wirkspektrum und setzen sich somit nur in die ATP-Bindungstaschen bestimmter Kinasen. Sie führen zusätzlich zu einer allosterischen Hemmung, also der Blockade von Protein-zu-Protein-Interaktionen (LONDON, 2014).

Einer der ersten TKI war Imatinib (Gleevec®, Novartis). Nachdem BUCHDUNGER und Kollegen bereits 1995 und 1996 festgestellt hatten, dass 2-Phenylpyrimidine sowohl *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog* (Abl) als auch den platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor (PDGFR) selektiv hemmen (BUCHDUNGER et al., 1995; BUCHDUNGER et al., 1996), wurden weitere Entwicklungsstudien angestellt. Diese führten schließlich zur Entstehung von STI571, das heute als Glivec® (Europa/Australien), bzw. Gleevec® (USA) von der Firma Novartis auf dem Markt ist (DRUKER & LYDON, 2000). Imatinib wurde bereits bei Hunden mit Mastzelltumoren angewendet. Von den 21 in dieser Studie behandelten Hunden wurde bei 10 Tieren bereits in den ersten 14 Tagen der Therapie eine partielle oder komplette Remission verzeichnet. Die verbleibenden 11 Hunde zeigten entweder ein progressives Tumorwachstum oder eine Stagnation der Größenzunahme. Allerdings wurden nur 6 Hunde länger als 14 Tage therapiert, da die Besitzer der anderen 15 die Therapie aufgrund der hohen Kosten abbrachen. Bei diesen 6 Hunden wurden die Tumoren zwar graduell kleiner, doch keiner erfuhr eine komplette Remission (ISOTANI et al., 2008). In einer weiteren Verträglichkeitsstudie wurden 2005 9 Katzen mit unterschiedlichen Neoplasien (FISS, Mastzelltumor, Plattenepithelkarzinom) mit Imatinib behandelt. Dabei konnte lediglich bei den FISS-Katzen eine *stable disease* (SD) erreicht werden (LACHOWICZ et al., 2005).

Mittlerweile gibt es in der Humanmedizin über 20 TKI mit unterschiedlichen Zielkinasen und somit auch unterschiedlichen Indikationen. Sie wurden jedoch bisher noch nicht hinsichtlich ihrer Effektivität und Tolerabilität bei Hunden und Katzen untersucht. Dies ist unter anderem auch dadurch begründet, dass vor einigen Jahren die beiden, speziell für Hunde zugelassenen, TKI Masitinib und Toceranib auf den Markt kamen.

4.2. Toceranib

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaft erteilte dem TKI Toceranib im September 2009 die Zulassung. Seit Juli 2010 ist dieser in Deutschland kommerziell unter dem Namen Palladia® erhältlich.

Es wurde ursprünglich als antiangiogenetischer Wirkstoff entwickelt, aufgrund seiner großen Bandbreite an Zielkinasen hat es jedoch auch eine direkte

Antitumoraktivität (LONDON, 2014). Dieser *small molecule inhibitor* weist eine Indolstruktur auf und hemmt selektiv VEGFR, PDGFR und Kit (LONDON et al., 2003), doch weitere, noch nicht veröffentlichte Untersuchungen von LONDON und Kollegen lassen eine zusätzliche Aktivität gegenüber weiterer *split*-Kinasen vermuten (LONDON, 2014). In einer ersten *in vitro*-Studie zeigte sich bereits, dass Toceranib oder SU11654 den Zellzyklus zum Stillstand bringen und somit zur Apoptose von Tumorzellen in Zelllinien mit mutierten Splitkinase-Rezeptor-Tyrosinkinasen führen kann (LIAO et al., 2002). Außerdem konnte anhand eines Mausmodells sein antiproliferativer Effekt auf Endothelzellen bewiesen werden. Den Mäusen wurden unterschiedliche Tumorzelllinien implantiert und die orale Verabreichung des Wirkstoffs führte bei vielen zu einer Stagnation des Tumorwachstums, zum Teil sogar zur Tumorregression (MENDEL et al., 2003). 2003 veröffentlichten LONDON und Kollegen dann die Ergebnisse einer Phase-I-Studie zur Dosisfindung, in der 57 Hunde mit unterschiedlichen Neoplasien im fortgeschrittenen Stadium mit SU11654 therapiert wurden. Sie errechneten eine Gesamtansprechrate von 28 %, wobei 6 Hunde mit Mastzelltumoren in komplette Remission gingen und weitere 10 Hunde mit unterschiedlichen Tumorarten, darunter Mastzelltumoren, metastasierte Mammakarzinome, metastasierte Weichteilsarkome und einem multiplen Myelom, zeigten eine partielle Remission. Bei weiteren Neoplasien konnte eine vorübergehende Stagnation des Wachstums erreicht werden, nämlich bei Melanomen, Osteosarkomen, Übergangszellkarzinomen der Harnblase, einem primären Lungenkarzinom sowie einem Plattenepithelkarzinom und einem T-Zell-Lymphom. Nebenwirkungen traten vor allem auf, wenn das Medikament täglich verabreicht wurde. Die Hunde, die SU11654 nur jeden zweiten Tag erhielten, hatten in der Regel nur milde Nebenwirkungen, die mit unterstützender Therapie behandelt werden konnten. Es wird von Durchfall, Anorexie und Erbrechen berichtet. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass diese gastrointestinalen Symptome durch die verminderte Durchblutung der Magen- und Darmschleimhaut verursacht werden. Ein weiterer Grund für Diarrhoe könnte die Dysfunktion der Kit-abhängigen, interstitiellen Kajal-Zellen sein, die zur Hypermotilität des Darms führen könnte. Bei mehreren Hunden wurden milde Neutropenien festgestellt, die bei vielen trotz fortgeführter Therapie von selbst verschwanden, bei einzelnen Hunden blieben sie jedoch über die gesamte Behandlungsdauer bestehen. Anämien und Thrombozytopenien, die bei 5, beziehungsweise 3 Tieren auftraten,

wurden bei der Mehrzahl der Hunde eher mit der Neoplasie selbst als mit der SU11654-Therapie in Verbindung gebracht. Sechs Hunde entwickelten im Laufe der Therapie eine milde bis moderate Hinterhandlahmheit, die bei einigen Hunden mit Muskelschmerzen assoziiert war, eine definitive Ursache für diese Lahmheiten konnte nicht gefunden werden. Außerdem konnte bei 4 Hunden ein Anstieg des Harnstoffes und des Kreatinins und bei 2 Tieren eine Erhöhung der Alaninaminotransferase gemessen werden (LONDON et al., 2003). In einer Folgestudie konnten PREYER und Mitarbeiter beweisen, dass SU11654 die Phosphorylierung von Kit in Mastzelltumoren Dosis-abhängig hemmt (PREYER et al., 2003). In einer ersten großen Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie untersuchten LONDON und Mitarbeiter dann 2009 die Effektivität von Toseranib zur Behandlung von rezidivierenden Mastzelltumoren. Wobei die Remissionsrate mit 37,2 % in der Therapiegruppe statistisch signifikant höher war als in der Kontrollgruppe mit 7,8 %. Am häufigsten wurden hier gastrointestinale Nebenwirkungen beobachtet. Durchfall, Erbrechen und Anorexie traten bei mehr als der Hälfte der Patienten auf und waren bei knapp 12 bis 14 % schwerwiegend bis lebensbedrohlich (Grad 3 und 4 nach den *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria v.2.0*, die an den Hund angepasst wurden). Bei einzelnen Hunden kam es auch zu Grad 3 und 4 Anämien, Thrombozytopenien, Neutropenien, Hypalbuminämien sowie Erhöhungen der Alaninaminotransferase (ALT) und/oder des Kreatinins. Auch Gewichtsverlust und Dehydratation waren bei 2,8 %, beziehungsweise 2,1 % der Hunde hochgradig. Allerdings traten diese Grad 3- und 4-Nebenwirkungen bei 20,7 % der Toseranibgruppe, aber auch bei 15,6 % der Kontrolltiere auf, so dass hier kein statistisch signifikanter Unterschied bestand. Die Autoren postulieren, dass die vorwiegend gastrointestinalen Nebenwirkungen nicht unbedingt mit dem Studienmedikament assoziiert waren, sondern auch durch die Ausschüttung von Histamin aus den neoplastischen Mastzellen und die daraus resultierende vermehrte Ausschüttung von Magensäure bedingt sein konnten. Weitere Nebenwirkungen, die nur mild bis moderat ausgeprägt auftraten, waren Pruritus, Pigmentstörungen der Haut, Dermatitis, muskuloskelettale Veränderungen und Lahmheiten (LONDON et al., 2009). Im gleichen Jahr führten YANCEY und Kollegen eine Studie zu Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von Toseranib durch. Sie eruierten, dass es bei Hunden eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweist. Bei einer Dosierung von 3,25 Milligramm pro Kilogramm jeden zweiten Tag werden ausreichend hohe

Plasmakonzentrationen erreicht, die für die Effektivität nötig sind, allerdings sinken sie innerhalb der 2 Tage auf subtherapeutische Konzentrationen ab (YANCEY et al., 2010b), was jedoch für die Verträglichkeit essentiell zu sein scheint, wie sich in den Vorgängerstudien gezeigt hatte (LONDON et al., 2003; PRYER et al., 2003; LONDON et al., 2009). Toceranib wird vorwiegend hepatisch verstoffwechselt und 92 % werden über den Kot ausgeschieden, nur 7 % der Clearance sind renal (YANCEY et al., 2010b). Die gleichen Autoren führten auch noch eine zusätzliche pharmakokinetische Untersuchung durch. Sie ermittelten, dass Toceranib mit oder ohne Futter verabreicht werden kann, da es keinen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen hat, ob der Hund nüchtern ist oder sein Medikament mit einer Mahlzeit einnimmt. Außerdem fanden sie heraus, dass weder Absorption noch Elimination von Toceranib rasse- oder altersabhängig sind und auch das Tumorstadium und Begleitbehandlungen haben keinen Einfluss darauf. In dieser Studie zeigte Toceranib mit 76,9 % ebenfalls eine gute orale Bioverfügbarkeit und auch nach einer Therapiephase von 90 Tagen kommt es zu keiner signifikanten Kumulation im Körper, so dass es sich als Langzeittherapie eignen könnte (YANCEY et al., 2010a).

CARLSTEN und Kollegen untersuchten in einer Multicenter-Studie die Effizienz einer Kombinationstherapie aus Toceranib gemeinsam mit Prednisolon und hypofraktionierter Radiotherapie bei caninen Mastzelltumoren. Dabei erreichten sie bei 58,8 % eine komplette, bei 17,6 % der Hunde eine partielle Remission. Zu einer Progression des Tumorwachstums kam es nach median 316 Tagen. Die Behandlung wurde im Allgemeinen gut vertragen, wobei bei einigen Patienten eine Therapiepause oder eine Dosisreduktion vorgenommen werden musste (CARLSTEN et al., 2012). Ebenfalls viel versprechend scheint die gemeinsame Gabe von Toceranib mit Calcitriol zu sein, den synergistischen Effekt dieser Kombinationstherapie wiesen MALONE et al. nach (MALONE et al., 2010). Auch eine gleichzeitige Behandlung mit Vinblastin und Toceranib wurde bereits auf ihre Verträglichkeit geprüft. Die maximal tolerierte Dosis des Vinblastins lag dabei bei weniger als der Hälfte der üblichen Dosierung, weshalb die Autoren zu dem Schluss kamen, dass sich diese Kombination wahrscheinlich weniger für die klinische Anwendung eignet. Allerdings konnte trotz dieser stark verringerten Dosis bei 71 % der Hunde ein Ansprechen verzeichnet werden. Jedoch kam es zur Verschlimmerung der Myelosuppression, was vermuten lässt, dass die beiden

Medikamente eine additive oder synergistische Wirkung aufweisen (ROBAT et al., 2011).

Auch bei Schilddrüsenkarzinomen und metastasierten Osteosarkomen wurde Toceranib in ersten Studien angewendet. Dabei wurde bei 4 von 11 Schilddrüsenkarzinomen eine partielle Remission erreicht und bei 7 weiteren blieben die Tumoren in der Größe stabil. Von 22 metastasierten Osteosarkomen konnte bei einem eine partielle Remission gemessen werden und bei 9 weiteren kam es zum vorübergehenden Wachstumsstillstand (LONDON et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse brachte die Versuchstherapie mit Toceranib bei caninen Analbeutel- und Analdrüsenkarzinomen. Von 35 behandelten Hunden zeigten 9 ein partielles Ansprechen und bei 22 stagnierte das Tumorwachstum für median 25 Wochen (CLIFFORD et al., 2010). Auch die *off-label*-Anwendung von Toceranib bei 8 caninen *head and neck*-Karzinomen und 7 nasalen Karzinomen erbrachte viel versprechende Ergebnisse. Bei Ersteren wurden eine komplette und 5 partielle Remissionen beobachtet. Eines der nasalen Karzinome zeigte eine komplette Remission infolge der TKI-Therapie, bei 4 weiteren konnte eine Wachstumsstagnation erreicht werden (LONDON, 2014). Hierbei stellten LONDON fest, dass auch mit einer geringeren Dosierung von 2,8 statt 3,25 Milligramm pro Kilogramm und der Gabe des Medikaments dreimal pro Woche (Montag, Mittwoch, Freitag) statt jedem zweiten Tag gute Ergebnisse erzielt werden können (LONDON, 2014). CHON und Kollegen postulierten anhand von Ergebnissen einer Phase I-Studie zur Sicherheit einer Kombinationstherapie aus Toceranib und Piroxicam, dass der TKI und der Cyclooxygenase-2-Hemmer als gemeinsame Therapie in der Regel gut vertragen werden. Doch wie bei der Behandlung mit Toceranib allein war bei einzelnen Hunden eine Therapiepause sowie eine Dosisanpassung nötig um eine bessere Verträglichkeit zu erreichen (CHON et al., 2011). In einer weiteren Studie zur Therapie von primären Plattenepithelkarzinomen der Stirnhöhle wurden die 3 Hunde zu Beginn mit Carboplatin und Piroxicam therapiert. Einer der Patienten wurde dann auf ein Therapieregime mit Piroxicam und Toceranib umgestellt und es kam zu einer signifikanten Reduktion der Tumorbürde. Nach 194 Tagen wurde der Hund aufgrund eines Rezidivs euthanasiert (DE VOS et al., 2011). WILES et al. setzten Toceranib bei Katzen mit oralen Plattenepithelkarzinomen ein, wobei fast die Hälfte der Tiere kein Ansprechen auf die Therapie und ein progressives

Tumorstadium zeigte, lediglich 3 von 23 Katzen, die neben dem TKI auch mit einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum behandelt wurden erfuhr eine komplette, beziehungsweise partielle Remission (WILES et al., 2016). LONDON vermutet, dass Toceranib sich auch für eine metronomische Therapie eignen könnte, da es in der Studie von MITCHELL, THAMM und BILLER zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen (*Tregs*) im peripheren Blut führte (MITCHELL et al., 2012). Aufgrund dieser Theorie untersuchten LONDON et al. 2015, ob die Ergänzung der metronomischen Therapie mit Piroxicam und Cyclophosphamid durch Toceranib bei Patienten mit Osteosarkomen (Zustand nach Amputation und Carboplatin-Chemotherapie) zu einer Verbesserung des *Outcome* führt. Allerdings konnte weder hinsichtlich des krankheitsfreien Intervalls noch der 1-Jahres-Überlebensrate ein statistisch signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (LONDON et al., 2015).

4.3. Masitinib

Der TKI Masitinib wurde im November 2008 von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA (*european medicine agency*) zur Behandlung von caninen inoperablen Mastzelltumoren zweiten und dritten Grades zugelassen. Er wurde von der französischen Firma ABScience entwickelt und ist seit Juni 2009 als Masivet® in allen EU-Ländern kommerziell erhältlich. In den USA ist Masitinib seit Mitte Dezember 2010 zugelassen und wird unter dem Namen Kinavet® verkauft.

Masitinib oder AB1010 ist ein Phenylaminothiazol-TKI. In einer ersten präklinischen Studie evaluierten DUBREUIL und Mitarbeiter seine *in vitro* und *in vivo* Aktivität und stellten den Vergleich zu Imatinib an. Dabei fanden sie heraus, dass Masitinib ein starker Inhibitor der Tyrosinkinasen Kit und PDGFR ist, aber auch bei der Lyn-Kinase, einer wichtigen Komponente in der Signaltransduktion, die zur IgE-induzierten Mastzelldegranulation führt, zeigt sich eine gute Hemmung (GILFILLAN & TKACZYK, 2006). Am FGFR ist die Inhibition weniger stark ausgeprägt. Eine nur schwache bis gar keine Wirkung hat AB1010 auf die Abl, sowie den VEGFR. Außerdem wurde festgestellt, dass Masitinib bei Mäusen, deren implantierte Tumoren mutiertes Kit exprimierten, das Tumorstadium dosis-abhängig hemmt und die Überlebenszeit positiv beeinflussen kann. Es stellte sich heraus, dass Masitinib eine gute orale Bioverfügbarkeit besitzt und keine Nebenwirkungen in den behandelten Mäusen

hervorrufen (DUBREUIL et al., 2009). Basierend auf diesen Ergebnissen führten HAHN und Kollegen eine randomisierte, kontrollierte Phase III-Studie durch, in die sie 202 Hunde mit nicht resezierbaren Mastzelltumoren einschlossen. Sie wiesen eine signifikante Verlängerung der rezidivfreien Zeit nach und auch die Gesamtüberlebenszeit der mit Masitinib behandelten Gruppe war länger als die der Placebo-Gruppe, wenn auch nicht statistisch signifikant. Diarrhoe und Vomitus waren die Nebenwirkungen, die am häufigsten auftraten. Sie zeigten sich auch signifikant häufiger in der Therapiegruppe als in der Gruppe, die mit dem Placebo behandelt wurde. Allerdings waren sie in der Regel mild bis moderat ausgeprägt und dauerten median 15 Tage an. Doch es kam auch zu gastrointestinalen Nebenwirkungen, die so schwerwiegend waren, dass die Behandlung mit dem TKI abgebrochen wurde. Außerdem entwickelten 12 Hunde Nierenerkrankungen aufgrund derer die Therapie beendet werden musste. Drei dieser 12 Hunde mussten aufgrund der Nephropathie euthanasiert werden. Neutropenien wurden bei 10 Hunden gemessen, waren aber bei keinem Patienten mit klinischen Symptomen verbunden, obwohl bei einem der Hunde die Zahl der Granulozyten sogar auf unter 500 pro Mikroliter gesunken war. Eine hämolytische Anämie wurde bei 2,5 % der mit Masitinib behandelten Hunde festgestellt. Bei 3 der 4 Hunde stieg der Hämatokrit innerhalb von 14 Tagen mit entsprechender Behandlung wieder in den Referenzbereich an (HAHN et al., 2008). Nach 2 Jahren untersuchten die Autoren dann die Überlebensraten von 132 Hunden aus der vorangegangenen Studie. Nach 12 Monaten waren noch 90,9 % der mit Masitinib behandelten Tiere am Leben, nach 24 Monaten noch 78 % (HAHN et al., 2010). Eine retrospektive Analyse von 26 Hunden mit metastasierten und nicht resezierbaren Mastzelltumoren ergab eine Gesamtansprechrate von 50 %, wobei die Tiere, die auf die Therapie ansprachen eine signifikant längere Überlebenszeit aufwiesen. Zusätzlich fanden die Autoren heraus, dass die biologische Aktivität des Medikaments in Primärtumoren höher zu sein scheint als in Rezidiven. Nebenwirkungen traten bei mehr als 60 % der Tiere auf (SMRKOVSKI et al., 2015). MILLER et al. konnten wiederum aufzeigen, dass Hunde deren Patnaik Grad II-Mastzelltumoren chirurgisch entfernt wurden und die anschließend eine Kombinationstherapie aus Vinblastin und Prednisolon erhielten mit 1964 Tagen medianer Überlebenszeit eine signifikant höhere Lebenserwartung hatten als solche, die post operationem Masitinib erhalten hatten (MILLER et al., 2014).

Aufgrund von Ergebnissen humanmedizinischer Studien (HUMBERT et al., 2010; MITRY et al., 2010) postulierten THAMM und Kollegen, dass Masitinib auch ein potentieller Chemosensitizer sein könnte und führten entsprechende Untersuchungen an Zelllinien verschiedener caniner Neoplasien durch. Dabei stellte sich heraus, dass sich eine Kombination aus Doxorubicin und Masitinib zur Therapie von B-Zell-Lymphomen, Hämangiosarkomen, Melanomen und Harnblasenkarzinomen eignen könnte. Außerdem erhöhte der TKI die Chemosensitivität von histiozytären Sarkomzellen gegenüber Vinblastin um das vierundsiebzifache und verbesserte die Wirkung von Gemcitabine bei Osteosarkomen und Mammakarzinomen (THAMM et al., 2011). LYLES und Kollegen konnten in einer in vitro-Studie zeigen, dass Masitinib die Zellproliferation in Hämangiosarkom-Zelllinien Dosis-abhängig inhibiert (LYLES et al., 2012). 2013 erschien dann eine Studie, die bewies, dass Masitinib die Funktion des P-Glycoproteins inhibiert und damit gegenüber Doxorubicin resistente canine lymphatische Leukämie-Zellen wieder sensibel für Chemotherapeutika machen kann. Allerdings stellen die Autoren in Frage, ob unter in vivo Verhältnissen ausreichende Konzentrationen für diesen Effekt erreicht werden können (ZANDVLIET et al., 2013).

Doch Masitinib findet nicht nur in der Onkologie Anwendung. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie ermittelten CADOT und Mitarbeiter die Effizienz des Medikaments bei atopischer Dermatitis beim Hund. Dabei besserten sich die klinischen Symptome bei signifikant mehr Tieren der Therapiegruppe als der Kontrollgruppe. Auch im Vergleich der Hunde, deren atopische Dermatitis bisher weder auf Cyclosporin noch auf Kortikosteroide angesprochen hatte, zeigten signifikant mehr Tiere der Masivetgruppe als der Kontrollgruppe einen positiven Krankheitsverlauf. Nebenwirkungen traten in beiden Gruppen in nahezu gleicher Häufigkeit auf, allerdings wurden nur in der Therapiegruppe schwerwiegende Nebenwirkungen verzeichnet. Ein Hund starb vermutlich an Masitinib-induziertem Leberversagen, ein anderer musste infolge von Nierenversagen euthanasiert werden. Weitere Nebenwirkungen waren nur mild oder moderat ausgeprägt. Die 4 häufigsten stellten Hypalbuminämie, Proteinverlust, Anstieg der Aminotransferasen sowie Leukopenien dar. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Masitinib ein Therapiealternative in der Behandlung der caninen atopischen Dermatitis darstellt (CADOT et al., 2011).

Einer der Hunde dieser Doppelblindstudie wurde von SUM und Kollegen in einem Fallbericht näher beschrieben. Er entwickelte 5 Wochen nach Therapiebeginn eine Proteinurie, weitere 2 Wochen später wurde er aufgrund des Verdachts einer subakuten Glomerulopathie stationär aufgenommen. Es wurden Biopsien aus beiden Nieren entnommen und eine *Minimal Change Nephropathy* diagnostiziert. Nach Absetzen der Masitinibtherapie konnte kein Protein mehr im Urin nachgewiesen werden und auch alle anderen klinischen und hämatologischen Veränderungen verschwanden (SUM et al., 2010).

Nachdem BELLAMY und Kollegen 2008 in einer ersten Studie der Pharmakokinetik von Masitinib bei Katzen herausfanden, dass auch in dieser Spezies die orale Administration eine gute Bioverfügbarkeit aufweist und besser vertragen wird als eine intravenöse Gabe (BELLAMY et al., 2009), evaluierten DALY und Mitarbeiter 2011 seine Sicherheit an 20 gesunden Katzen. Dabei wurde 10 Katzen das Medikament täglich verabreicht, die anderen 10 Tiere bekamen es nur jeden zweiten Tag. Am häufigsten wurden gastrointestinale Nebenwirkungen beobachtet, bei insgesamt 13 Katzen kam es zu Vomitus und/oder Diarrhoe, allerdings bedurfte keine der Katzen einer Therapie und die Symptome besserten sich von selbst. Neutropenien wurden bei 3 Katzen gemessen, wobei sie bei 2 Katzen eine Dosisreduktion erforderlich machten. Weitere 2 Katzen entwickelten eine Proteinurie mit einem Urin-Protein-Kreatinin-Verhältnis über 5. Die Katzen verloren im Laufe der Studie an Gewicht, ihre Kreatininwerte stiegen signifikant an und die Serumalbuminkonzentration sank signifikant ab. Doch insgesamt wurde Masitinib, das über 4 Wochen verabreicht wurde, gut vertragen (DALY et al., 2011). Es hat sich außerdem herausgestellt, dass Masitinib Dosis-abhängig einerseits die Zellproliferation in FISS-Zelllinien verringert und andererseits die Apoptoserate der Zellen erhöht (TUREK et al., 2010). Wie bereits in einem früheren Kapitel erwähnt gibt es eine Studie, die die Wirkung des TKI in FISS-Primärtumoren und -Metastasen untersuchte. Hier zeigte sich, dass Masitinib die Autophosphorylierung von PDGFR und, bei höheren Wirkstoffkonzentrationen auch das Zellwachstum von FISS-Zellen hemmt (LAWRENCE et al., 2012).

III. PUBLIKATIONEN

1. *Letter of acceptance* zu dem Artikel „*The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and site effects*“

Veterinary and Comparative Oncology - Decision on Manuscript VCO-2015-054.R1

From: david.argyle@ed.ac.uk

To: n.holtermann@web.de

Date: 29.11.2015 17:27

29 – Nov – 2015

Dear Miss Holtermann,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled “The Tyrosine Kinase Inhibitor Toceranib in Feline Injection Site Sarcoma: Efficacy and Side Effects” in its current form for publication in Veterinary and Comparative Oncology.

Thank you for your fine contribution and on behalf of the Editors of Veterinary and Comparative Oncology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley’s Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Yours sincerely,

Prof. David Argyle

Co-Editor, Veterinary and Comparative Oncology

david.argyle@ed.ac.uk

2. Der Artikel „*The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and site effects*“

Veterinary and
Comparative Oncology

Original Article

DOI: 10.1111/vco.12207

The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects

N. Holtermann¹, M. Kiupel² and J. Hirschberger¹

¹Clinic of Small Animal Internal Medicine, Veterinaerstraße 13, Ludwig Maximilian University, 80539 Munich, Germany

²Institute of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Michigan State University, Lansing, MI, USA

Abstract

Because of their locally invasive growth and high recurrence rate despite of aggressive local therapy, treatment of feline sarcomas is challenging. The tyrosine kinase inhibitor (TKI) toceranib is currently licensed for the treatment of canine mast cell tumours. There are only few reports about TKI usage in cats. Previous studies indicated promising potential of TKI for the treatment of feline injection site sarcoma (FISS). In this prospective clinical trial, 18 cats with unresectable FISS were treated at a target dosage of 3.25 mg kg⁻¹ every other day to evaluate the clinical efficacy and toxicity of toceranib. There was no clinical response measurable. Adverse events were generally mild and temporary. Grade 3 or 4 adverse events developed infrequently and all resolved with drug holidays and dose reductions.

Keywords

clinical pathology,
comparative oncology,
molecular diagnostics,
oncology, surgical
oncology, tyrosine kinase

Introduction

Feline injection site sarcoma (FISS) is a very frustrating disease because of its aggressive biological behaviour and high recurrence rate. The majority of these soft tissue sarcomas arise at common injection sites of irritating substances, such as vaccines or other compounds, causing local inflammation.^{1–6} The chronic immune response results in inflammatory granulomas which may promote a neoplastic transformation of fibroblasts and myofibroblasts in genetically predisposed cats.⁷ The most effective treatment still remains radical surgical excision as a part of multidisciplinary approach.^{8–10} There are only a few studies about the treatment of unresectable fibrosarcoma. Barber *et al.* reported a moderate success with the administration of combined cyclophosphamid and doxorubicin.¹¹ A multicenter study of Poirier *et al.* comparing liposome-encapsulated doxorubicin and free doxorubicin showed an overall response rate of 39% in cats with macroscopic disease which lasted for median 84 days.¹² Rassnick *et al.* treated

cats with unresectable, recurrent or metastatic vaccine-associated sarcoma (VAS) with ifosfamid and showed an overall response rate of 41% (11/27) for median 70 days.¹³ In a recent study, Saba *et al.* evaluated the efficacy of lomustine in VAS and reported an overall response rate of 25% with a duration of 82.5 days.¹⁴ A better outcome was achieved with the use of concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiation therapy in advanced feline soft tissue sarcoma, where half of the cats had partial remission (PR), 2 of 10 went into complete remission and another 2 cats showed stable disease (SD). The median response duration was 237 days.¹⁵ But this treatment is cost-intensive and more inconvenient for owners and their cats.

Platelet-derived growth factor (PDGF) plays an important role in the growth of a number of different cells, like fibroblasts, vascular smooth muscle cells, brain glial cells and kidney mesangial cells.^{16–19} Five isoforms (PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, -DD) and their receptors [PDGF receptor (PDGFR)- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$, - $\beta\beta$] are known.

Correspondence address:
N. Holtermann
Tierklinik Hofheim
Germany
e-mail:
n.holtermann@web.de

Overexpression of PDGF-BB leads to endothelial proliferation, malignant transformation, invasion, angiogenesis, metastasis and inhibition of apoptosis of mesenchymal cells.¹⁷ Receptor dimerization induced by ligand binding of PDGF to extracellular immunoglobulin-like domains of PDGFR activates the intracellular tyrosine kinase which results in autophosphorylation of its tyrosine residues. The following downstream signal transduction leads to cell proliferation and inhibition of apoptosis.¹⁷ Katayama *et al.* determined that PDGFR- β and its consequent signal transduction contribute to cell growth and protection from apoptosis in feline VAS cell lines and one non-vaccine-associated FSA cell line.²⁰ In human medicine, it was shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in soft tissue sarcomas is correlated with stage, prognosis and histological grade.^{21,22} One study showed that fibrosarcoma in dogs expressed VEGF receptor (VEGFR)-2 in 100% and its ligand in 91.67% of cases.²³ Their assumption was that VEGF may have an autocrine function in the genesis in these neoplasias. Smith *et al.* analysed feline soft tissue sarcomas for the expression of Kit, the receptor for stem cell factor (SCF), which is normally expressed on hematopoietic stem cells, mast cells, melanocytes and in the central nervous system.^{24,25} Just 4 of the 46 tumours showed immunoreactivity for Kit in over 80% of the neoplastic cells, an additional 17% were weak positive (less than 10% of the cells positive). They concluded that factors other than Kit expression may have crucial influence on neoplastic transformation and proliferation in feline soft tissue sarcoma.²⁵ Dysregulation of Kit, caused by mutations that induce activation of Kit in the absence of SCF, has been identified in several human cancers including gastrointestinal stromal tumours, mastocytosis and acute myelogenous leukaemia.^{26–28} Kit mutations have also been detected in canine mast cell tumours which are causing uncontrolled signalling.^{29–31}

Toceranib phosphate, also known as SU11654 or Palladia® (Zoetis, Florham Park, NJ, USA), is a selective inhibitor of the tyrosine kinase activity of several members of the split kinase receptor tyrosine kinase family such as PDGFR, VEGFR and Kit.³² In a phase I dose-escalating study, London *et al.* postulated that a dose of 2.5–3.25 mg kg⁻¹

every other day is effective and well tolerated in dogs.³² It has a good oral bioavailability and can be administered with or without food without any impact on plasma drug concentrations in that species.³³

There are only a few and predominantly *in vitro* reports about the usage of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in feline neoplasia.^{20,34–37} The aim of this prospective study was to evaluate toceranib phosphate in the treatment of unresectable feline fibrosarcoma and its tolerability in cats.

Materials and methods

Animals

Cats with diagnosed FISS were prospectively enrolled in this trial between February 2010 and July 2012. All cats were treated at the clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilian University Munich, Germany. Cats with measurable tumour and free of other severe medical conditions were included. Cats pretreated with cytostatic therapy were excluded.

At their first visit, all cats underwent a complete physical examination documenting size and location of their FISS. Staging included abdominal ultrasound, three-view thoracic radiographs, complete blood count (CBC), serum biochemistry and urinalysis (UA) including urine protein creatinine ration (UP/C). Tumour diagnosis was histologically confirmed in 16 cats; in 2 cats, diagnosis was made based on clinical presentation and cytological findings. All cats were tested for feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) using SNAP FeLV/FIV Combo Test, Idexx Laboratories (IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA).

The cats were presented at days 8, 15 and 22 and then every 3 weeks. At days 8 and 15, physical examination, CBC and serum biochemistry were performed. At days 22, 43, 64 and 85, the urinalysis including UP/C was repeated in addition to the physical examination, CBC and serum biochemistry.

Treatment

Toceranib [using Palladia (toceranib phosphate)] was administered by the cats' owners

at a target dosage of 3.25 mg kg^{-1} every other day. Adverse events were recorded and graded according to the Veterinary Co-operative Oncology Group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) at each visit.³⁸ In case of grade 3 or 4 adverse events, treatment was withdrawn for at least 1 week or until symptoms resolved and blood values decreased adequately. Physical examination as well as blood analysis and UA (depending on which side effects caused the drug holidays) were repeated weekly until treatment could be resumed. The dose of toceranib was contingent on the pill size reduced by 33% when grade 4 adverse events occurred. In small cats already receiving 10 mg pills from the beginning, treatment intervals had to be prolonged to every third day or therapy had to be discontinued.

Response

Power analysis showed that at least 11 cats needed to be enrolled in this study to detect a PR in at least 50% of the patients with a power of 90% ($P=0.05$). Clinical response was assessed every 3 weeks according to response evaluation criteria in solid tumours, modified for the evaluation of FISS. At most, three tumours were defined as target lesions.³⁹ The longest diameter of each target lesion was measured using a calliper, and the sum of these measurements was used for assessment of response.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) for Kit, PDGF, PDGFR, VEGF, VEGFR and SCF was performed on serial sections of routinely formalin-fixed, paraffin-embedded tumours from tissue specimens taken prior to therapy. Deparaffinization and antigen retrieval were accomplished in the Dako PT Link (Dako, Carpinteria, CA, USA) using a high pH (SCF and PDGF) or low pH antigen retrieval solution (both Dako) for 20 min at 99°C . Immunostaining was performed on the Dako Autostainer Link 48 automated staining system (Dako) using a mouse monoclonal anti-human VEGFR at a dilution of 1:400, a rabbit polyclonal antihuman PDGFR, a rabbit polyclonal antihuman VEGF, and a mouse monoclonal anti-human SCF (all Santa Cruz Biotechnology, Dallas,

TX, USA), a rabbit polyclonal antihuman KIT antibody (Dako), a goat polyclonal antihuman PDGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) at a dilution of 1:100 followed by the Flex detection system with the appropriate secondary antibodies (Dako). The immunoreaction was visualized with 3,3-diaminobenzidine substrate (Dako) and sections were counterstained with haematoxylin. Positive immunohistochemical controls included feline mast cell tumours and soft tissue sarcomas that had previously been shown to express the targets to which the appropriate antisera were added. For negative controls, the primary antibodies were replaced with homologous non-immune sera. Samples were scored based on the labelling intensity of neoplastic cells and percentage of positive neoplastic cells. Tumours were scored as negative when the following criteria applied: no labelling in the examined sections, labelling was only observed in deeper, non-neoplastic tissue sections or less than or equal to 20% of neoplastic cells were positive. Tumours with more than 20% strongly positive cells were scored as positive. A score of weak positive labelling was assigned to tumours that had at least 20% of neoplastic cells with weak positive labelling, but less than 20% of neoplastic cells expressing strong labelling.

Results

Animals

Eighteen client-owned cats were included in this study, 16 cats had histologically confirmed sarcomas (14 fibrosarcomas, 1 myxofibrosarcoma, 1 myxosarcoma) and in 2 cats, diagnosis was made based on clinical presentation and cytological findings. Cats' age ranged from 7 to 14 years, with a median age of 11 years. The median body weight was 4.66 kg (range: 3.9–9.27 kg). There were 11 spayed female and 7 castrated male cats enrolled in this trial. Breed distribution was as followed: 15 domestic short-haired cats, 1 Maine Coon mix, 1 Carthusian mix and 1 mixed breed cat. Tumours were unresectable because of their size and/or side of occurrence. Seven cats were presented with tumours occurring for the first time, eight had their first recurrence, one had his second relapse and in two cats, the tumour recurred for the third

time. Those with recurrent disease were all previously treated by surgical resection, except one cat, which also received palliative radiation therapy for its first relapse 3 months before TKI treatment was started. Initially, the median longest tumour diameter was 6.1 cm (range: 0.8–13.0). One cat had two, another one had three separate tumours that all appeared in the same body region, located next to each other. None of the cats had more than three tumours, so there were no non-target lesions to measure. In seven cats, the tumours already lost their initially solid structure and showed a predominantly fluctuant consistency. The tumours of another two cats were superficially ulcerated. The majority of tumours were located in the interscapular region (6/19) and at the right thoracic wall (6/19), three tumours occurred at the left thoracic, two at the left abdominal wall and one at the left hind limb. All 18 cats were clinically healthy at the time of first examination, but 1 cat had a history of mild azotaemia. They were all tested negative for FeLV and FIV. Toceranib was given in a median dose of 2.56 mg kg^{-1} (range: $2.07\text{--}3.37 \text{ mg kg}^{-1}$) every other day. One cat accidentally received the medication every day.

Response

Four cats were censored for the evaluation of efficacy. Two were lost to follow up after the third visit (day 15: no measurement of the tumour). In one cat which showed SD on day 21, the owner decided to discontinue the treatment because of financial reasons. The remaining cat developed grade 4 serum alanine aminotransferase (ALT) activity elevation and treatment was discontinued on day 21. At that time the cat was in SD. The majority of cats (13/14) showed PD after median 43 days (range: 21–64 days) of treatment with toceranib. The one cat receiving palliative radiation therapy prior to TKI treatment had SD which lasted more than 85 days. Treatment was continued beyond 85 days scheduled for the study. The cat was euthanized 7 weeks later because of paraparesis of the hind limbs. The owners refused a post-mortem examination.

We expected at least a 30% decrease in the longest diameter of the tumour as a clinically relevant

Table 1. Adverse events in cats with unresectable FISS treated with toceranib

Adverse events	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Anorexia	10/18	–	–	–
Lethargy	5/18	2/18	–	–
Fever	1/18	–	–	–
Pruritus	3/18	1/18	–	–
Diarrhoea	1/18	–	–	–
Weight loss	–	2/18	–	–
Neutropenia	5/18	–	–	–
Lymphopenia	5/18	2/18	1/18	–
Anaemia	3/18	–	–	–
Thrombocytosis	3/18	–	–	–
ALT elevation	–	–	–	4/18
ALP elevation	–	1/18	–	–
Hypoglycaemia	–	2/18	–	–
Urea elevation	3/18	–	–	–
Hypocalcaemia	3/18	–	–	–
Creatinine elevation	–	1/18	–	–
Hyperkalaemia	–	1/18	–	–
Hypokalaemia	2/18	–	–	–
Hypoalbuminaemia	1/18	–	–	–
Proteinuria	7/18	5/18	–	–
UP/C elevation	1/18	–	–	–
Bilirubinuria	3/18	1/18	–	–
Lowered USG	4/18	3/18	–	–
Ketonuria	–	1/18	–	–

USG, urine specific gravity.

improvement when in fact the mean tumour diameter increased by 70%. A post-study power analysis revealed a power of >90% for those values and the seen standard deviation in the 14 cases evaluated.

Adverse events

Table 1 summarizes all adverse events. Serious adverse events included grade 4 ALT elevation in four cats (median 980 U/L; range: 365–3710 U/L). With the exception of an isolated grade 3 lymphopenia, other toxicities were infrequent and when occurred grade 1 or 2 in nature. One of those four cats with ALT elevation developed a concurrent grade 2 increase of the serum alkaline phosphatase activity (ALP).

The most common side effect observed was mild temporary anorexia which occurred in 10 of 18 cats. It was reported by the owners median on day 15 of treatment (range: 8–45 days). Five cats showed grade 1 lethargy over a couple of days, two showed grade 2 lethargy. One cat was presented with a mild fever of 39.9°C on day 15. Mild pruritus in the

tumour region occurred in three cats. Another cat developed a mild generalized pruritus. One cat lost 13.6% of her body weight although treated with toceranib over a period of 64 days, whereas her food intake and laboratory findings remained normal. Another one had 11.2% decrease of body mass in 21 days. This cat showed a reduced appetite over several days. UP/C rose over 0.8 and, in addition, a hypoalbuminaemia of 2.49 g dl^{-1} was measured in this cat.

Additional side effects in three cats were isolated increase of serum urea concentration (median $72.613 \text{ mg dl}^{-1}$; range: $69.67\text{--}84.264 \text{ mg dl}^{-1}$). An azotaemia with a serum creatinine concentration increase of nearly twofold over the upper reference range (3.63 mg dl^{-1}) as well as a grade 2 hyperkalaemia (5.8 mmol l^{-1}) was assessed in one of those three cats at day 8. This cat already had a clinical history of chronic renal disease but the azotaemia decreased to 1.99 mg dl^{-1} after 1 week without any intervention. The dose was still reduced from 3.26 to 2.40 mg kg^{-1} every other day at day 21. Serum creatinine concentration was within the reference range when measured 3 weeks later. This cat was initially presented with isosthenuria with a urine specific gravity of 1.015 which increased to 1.033 at day 43. UP/C actually decreased from 0.05 to lower than 0.03 in this cat. The one cat with grade 2 bilirubinuria showed concurrent decrease of haematocrit without changes in liver function parameters or liver enzymes. In all cats with bilirubinuria, there was also grades 1–2 proteinuria measurable on the urine stick.

Immunohistochemistry

IHC was available for 14 of the 18 cases. The results are summarized in Tables 2 and 3. All 14 tumours tested negative for Kit and positive for PDGFR, however 1 was only weak positive for PDGFR. Six of the 14 sarcomas expressed PDGF, 2 of the 6 showed only weak positive expression. VEGFR expression was verified in 13 tumours with 10 positive and 3 weak positive. VEGF staining was positive in seven cases and weak positive in another four, the remaining three were tested negative for VEGF expression. Five tumours showed no SCF expression, weak positive in four and positive staining in five were detected.

Table 2. IHC in cats with FISS before treatment with toceranib

	VEGF (%)	VEGFR (%)	PDGF (%)	PDGFR (%)	SCF (%)	Kit (%)
Positive	50	71	29	93	36	–
Weak positive	29	21	14	7	29	–
No labelling	21	7	57	–	36	100

Table 3. Receptor and factor expression

	VEGF/VEGFR (%)	PDGF/PDGFR (%)	Kit/SCF (%)
Both positive	40	20	0
One positive, one negative	6	53	33
One positive, one weak positive	40	26	0
One weak positive, one negative	6	0	26
Both negative	6	0	40

Discussion

This is the first study evaluating toceranib in cats. There was no clinical response to the TKI in the cats treated in this study. In contrast to our findings, the investigations of Katayama *et al.* showed promising potential treating FISS with the TKI imatinib *in vitro* and *in vivo*.²⁰ Lawrence *et al.* also proved that masitinib has antiproliferative and pro-apoptotic activity in FISS cell lines.³⁵ The high rate of PD in this study (11 of 14 cats evaluated) could be because of the relatively big dimensions of the tumours with a median longest diameter of 6.1 cm. In addition, some of the sarcomas (7/18) already lost their solid structure and were mainly of fluctuant consistency. This could be a sign of central necrosis which in turn indicates an impaired blood supply which could lower the concentration of toceranib within the tumour tissue.

The selection of cats included into this study was relatively inhomogenous. First time occurring tumors were included as well as recurrent tumors and 2 tumors were not fibrosarcomas but fibromyxosarcomas or myxosarcomas. But since there was no difference in their response to therapy censoring was deemed unnecessary.

Three weeks is a very short period of time and it is possible that a sarcoma growth simply stagnated

for some time so that SD occurred independent of our TKI treatment. The one cat that remained in SD for more than 85 days was the one receiving palliative radiation therapy 3 month prior to entering into our trial. It is possible that this tumour growth was still slowed down because of this earlier treatment. The tumour was localized in the interscapular region and the cat was ultimately euthanized 2 month after termination of the toceranib treatment because of paraparesis of the hind limbs. As no post-mortem examination was performed in this cat, one could only speculate whether the paresis occurred because of radiation toxicity on the spinal cord or if it indicates that the tumour was growing in the ventral direction, finally compressing parts of the spinal cord. Because the tumours were only measured with a calliper, it could not be ruled out that this cat's tumour was steadily growing towards the inside where it was impossible for the examining clinician to see and evaluate. A computed tomography (CT) would have been a more accurate way to determine the size of the tumours. However, it is a cost-intensive diagnostic procedure which requires general anaesthesia. It would have been difficult to get the owners' consent to perform such a CT every 3 weeks.

There are no studies in veterinary medicine investigating the pharmacokinetics and dynamics of toceranib in cats. As no drug levels have been measured in the blood of the cats treated in this study, it could not be determined whether sufficient levels were achieved. The high number of cats showing no response to TKI treatment could also be because of impaired receptor binding of the drug or because of ineffective drug levels. Lawrence *et al.* already speculated that drug concentrations corresponding to the half minimal inhibitory concentration (IC_{50}) of the TKI masitinib used in feline injection site sarcoma cells are too toxic for feline patients.³⁵ That could indicate that the predominantly well-tolerated dose of toceranib used in this study was too low to be effective. All tumours stained positive or weak positive for PDGFR, a target of toceranib. It could have been suspected that the TKI must have efficacy in these tumours. Katayama *et al.* showed that PDGFR- β is involved in cell growth in VAS and FSA and that it protects VAS cells from apoptosis. They proved that

PDGFR- β is autophosphorylated in the presence of PDGF-BB.²⁰ In our investigation, eight tumours stained negative and four only weak positive for PDGF, only five had a concurrent positive or weak positive expression of PDGF and its receptor. PDGF-/PDGFR-pathway seemed not to have an influence on cell growth in these tumours. Our IHC showed that 10 tumours had positive or weak positive staining for both VEGF and its receptor. But in 6 of these 10 specimens at least 1 of the 2 reactants (receptor or ligand) stained only weak positive. Two of the four cats in which receptor and ligand both showed positive staining had PD on day 43. In one cat with this type of staining pattern treatment was discontinued on day 22 because of grade 4 ALT elevation. The remaining cat was the one which was still in SD on day 85. It is doubtful that VEGF has the same amount of autocrine function in tumourigenesis of FISS as it is suspected in dogs.²³ Our results support the hypothesis of Smith *et al.* that Kit does not play a crucial role in tumourigenesis in feline sarcoma as none of the 16 tumours examined showed immunoreactivity for Kit.²⁵

Anorexia seen in 10 of the 18 cats included in this study was a suspected adverse event as it was also frequently reported in dogs treated with toceranib.^{32,40} In one cat, it was associated with weight loss of 11.2% at day 21 (grade 2). This cat also had a grade 4 increased serum activity of ALT and grade 1 hypoalbuminaemia as well as an elevated UP/C. In this case, a drug holiday was recommended but the owner decided to stop the therapy because she could no longer afford it. In the remaining nine cats, the loss of appetite was mild and not associated with any changes in body weight. There was no need for intervention because it was only temporary and all cats returned to their normal eating habits after a few days. Furthermore, one cat suffered from a bite wound which may have been the cause for the mild anorexia. Grade 2 weight loss was seen in one other cat. As this patient did not show any alterations in its eating habits but had progressive tumour growth, it is possible that this cat suffered from cancer cachexia. However, weight loss was also documented in 35 of the 145 dogs in the study of London *et al.* which shows that it could also be a symptom related to toceranib.⁴⁰

The second most common side effect in our trial was grades 1–2 lethargy seen in seven cats (31.6%). This is consistent with the results of London *et al.*, in their study, 43.4% of the dogs showed lethargy. Yancey *et al.* indicated that clearance of toceranib is primarily hepatic in dogs.^{40,41} It is suspected that the metabolism of this drug is very similar in cats which could explain the severely increased serum activity of ALT in 4 of the 18 cats. It has also been seen in 24.1% of the dogs in the study of London *et al.*, however, only one dog had a grade 3 or 4 elevation.⁴⁰ In the dose-escalating study, 2 of the 47 dogs developed transient elevation of the liver enzyme which was not associated with specific clinical signs as in the cats of the current study. It decreased into reference range without intervention.³² However, it is possible that toceranib has a higher potential of liver toxicity in cats than in dogs. The mild neutropenia and lymphopenia seen in five cats, respectively, were also expected side effects since Kit is physiologically expressed by hematopoietic progenitor cells.⁴² The frequency of these cytopenias is consistent with that reported by London *et al.* for dogs.⁴⁰ Except for anorexia, fewer gastrointestinal side effects than expected were documented in this study. Only one cat developed grade 1, self limiting diarrhoea. In contrast to that over 20% of the dogs in the clinical trial of London *et al.* were presented with bloody stool, gastrointestinal bleeding and hemorrhagic diarrhoea.⁴⁰ However, this is a common paraneoplastic syndrome of patients with mast cell tumours for which all dogs were treated in this study. But in the study by London *et al.* (2003) of dogs with a broad spectrum of malignancies were included and several of those enrolled in the daily dosing scheme developed grades 1–3 gastrointestinal signs which were in part resistant to symptomatic therapy.³² The authors hypothesized that this could be because of mucosal damage in result of an impaired blood flow or because of a disruption of the function of the interstitial cells of Cajal which are dependent on Kit signalling.³² A grade 2 increase of creatinine occurred at day 8 in the cat which was known to have a suspected chronic renal disease. Interestingly, the value had decreased 1 week later without any treatment adjustments. Nevertheless, the toceranib dose was reduced

by 36% to 2.4 mg kg^{-1} . Consequently, the serum concentration of creatinine decreased under the value measured before TKI treatment was started. The one cat receiving toceranib in a daily manner had mild anorexia over the first 5 days of treatment. The cat showed progressive disease on day 21. That could indicate that daily dosing of toceranib is well tolerated, at least over a short period of time but does not seem to be more effective in treating FISS.

In summary, this study did not show any clinical efficacy in cats with unresectable FISS treated with the TKI toceranib. However, it was well tolerated and adverse events were generally mild and resolved with drug holidays and/or dose reductions. Limitations such as the small sample size and previous treatment of one cat with radiation therapy should be noted.

References

1. Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB and Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993; **203**: 396–405.
2. Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, *et al.* Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; **223**: 1283–1292.
3. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991–1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; **205**: 1425–1429.
4. Gagnon AC. Drug injection associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Practice* 2000; **28**: 18–21.
5. Buracco P, Martano M, Morello E and Ratto A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *The Veterinary Journal* 2002; **163**: 105–107.
6. Esplin DG, Bigelow M and McGill LD. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Veterinary Cancer Society Newsletter* 1999; **23**: 8–9.
7. Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Investigation* 1999; **17**: 273–277.

8 N. Holtermann *et al.*

8. Romanelli G, Marconato L, Olivero D, Massari F and Zini E. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008; **232**: 1193–1199.
9. Liptake JM, Forrest LJ. Soft tissue sarcomas. In: Withrow SJ, Vail, David M., editor. Withrow & MacEwan's small animal clinical oncology. Philadelphia: Saunders; 2007: 442–449.
10. Ogilvie GK. Recent advances in the treatment of vaccine-associated sarcomas. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 2001; **31**: 525–533, vi–vii.
11. Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL and Shofer FS. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2000; **36**: 416–421.
12. Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, *et al.* Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; **16**: 726–731.
13. Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, Rosenberg MP, Kristal O, Chaffin K, *et al.* Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 2006; **67**: 517–523.
14. Saba CF, Vail DM and Thamm DH. Phase II clinical evaluation of lomustine chemotherapy for feline vaccine-associated sarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; **10**(4): 283–291.
15. Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M and Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2010; **51**: 349–355.
16. Floege J, Johnson RJ, Alpers CE, Fatemi-Nainie S, Richardson CA, Gordon K, *et al.* Visceral glomerular epithelial cells can proliferate *in vivo* and synthesize platelet-derived growth factor B-chain. *The American Journal of Pathology* 1993; **142**: 637–650.
17. Heldin CH, Ostman A and Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; **1378**: F79–F113.
18. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, *et al.* Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Research* 1992; **52**: 3213–3219.
19. Nister M, Claesson-Welsh L, Eriksson A, Heldin CH and Westermark B. Differential expression of platelet-derived growth factor receptors in human malignant glioma cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; **266**: 16755–16763.
20. Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH and Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2004; **54**: 25–33.
21. DuBois S and Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer* 2007; **109**: 813–819.
22. Chao C, Al-Saleem T, Brooks JJ, Rogatko A, Kraybill WG and Eisenberg B. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Annals of Surgical Oncology* 2001; **8**: 260–267.
23. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B and Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas. *Journal of Comparative Pathology* 2009; **141**: 229–236.
24. Galli SJ, Zsebo KM and Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology* 1994; **55**: 1–96.
25. Smith AJ, Njaa BL and Lamm CG. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 934–939.
26. Advani AS. C-kit as a target in the treatment of acute myelogenous leukemia. *Current Hematology Reports* 2005; **4**: 51–58.
27. Lasota J and Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Seminars in Diagnostic Pathology* 2006; **23**: 91–102.
28. Gotlib J. KIT mutations in mastocytosis and their potential as therapeutic targets. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2006; **26**: 575–592.
29. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC and Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 1999; **27**: 689–697.
30. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K and Caughey GH. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *The Journal of Investigative Dermatology* 1999; **112**: 165–170.

31. Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE and London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 1718–1723.
32. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, *et al.* Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research* 2003; **9**: 2755–2768.
33. Yancey MF, Merritt DA, Lesman SP, Boucher JF and Michels GM. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2010; **33**: 162–171.
34. London CA. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009; **24**: 106–112.
35. Lawrence J, Saba C, Gogal R Jr, Lamberth O, Vandenplas ML, Hurley DJ, *et al.* Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology* 2012; **10**: 143–154.
36. Isotani M, Yamada O, Lachowicz JL, Tamura K, Yagihara H, Fujino Y, *et al.* Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *British Journal of Haematology* 2010; **148**: 144–153.
37. Lachowicz JL, Post GS and Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005; **19**: 860–864.
38. Veterinary Co-operative Oncology Group. Veterinary Co-operative Oncology Group – Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 195–213.
39. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz L, Sargent D, Ford R, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 2009; **45**: 228–247.
40. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, *et al.* Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research* 2009; **15**: 3856–3865.
41. Yancey MF, Merritt DA, White JA, Marsh SA and Locuson CW. Distribution, metabolism, and excretion of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2010; **33**: 154–161.
42. Besmer P. The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Current Opinion in Cell Biology* 1991; **3**: 939–946.

3. *Letter of acceptance* zu dem Artikel “*Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma*”

Veterinary and Comparative Oncology - Decision on Manuscript VCO-2014-087.R3

From: david.argyle@ec.ac.uk

To: n.holtermann@web.de

Date: 04.05.2015 13:55:05

04-May-2015

Dear Miss Holtermann,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Masitinib Monotherapy in Canine Epitheliotropic Lymphoma" in its current form for publication in Veterinary and Comparative Oncology.

Thank you for your fine contribution and on behalf of the Editors of Veterinary and Comparative Oncology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Yours sincerely,

Prof. David Argyle

Co-Editor, Veterinary and Comparative Oncology

david.argyle@ed.ac.uk

4. Der Artikel “*Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma*”

Veterinary and
Comparative Oncology

Original Article

DOI: 10.1111/vco.12157

Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma

N. Holtermann¹, M. Kiupel², M. Kessler³, E. Teske⁴, D. Betz⁵ and J. Hirschberger¹

¹Medizinische Kleintierklinik, Ludwig Maximilians University Munich, Munich, Germany

²Department of Pathology and Diagnostic Investigations, College of Veterinary Medicine, Michigan State University, Diagnostic Center for Population and Animal Health, Lansing, MI, USA

³Tierklinik Hofheim, Im Langgewann 9, 65719 Hofheim/Taunus, Germany

⁴Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Veterinary Faculty, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

⁵Klinik für Kleintiere, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Abstract

This study evaluated efficacy and side effects of masitinib in canine epitheliotropic lymphoma. Complete remission occurred in 2 of 10 dogs and lasted for median 85 days. Five dogs went into partial remission for median 60.5 days. Three pretreated dogs did not respond to therapy. Side effects occurred in six dogs and were mostly mild to moderate. Immunohistochemistry was available for eight dogs. KIT receptor was negative in all of them, six of eight lymphomas stained strongly positive for stem cell factor (SCF). platelet-derived growth factor (PDGF)-AA was weakly positive in two and negative in six. PDGF-BB was negative in four tumours, weakly positive in one and strongly positive in three. One was strongly positive for PDGF receptor (PDGFR)- β , seven were negative for that receptor. Five showed strong expression of PDGFR- α , two showed weak expression, one was negative. In conclusion, masitinib is effective in treating canine epitheliotropic lymphoma. But its effects are most likely not generated through the KIT receptor.

Keywords

clinical pathology,
oncology, small animal,
tumour biology, tyrosine
kinase

Introduction

Canine epitheliotropic T-cell lymphoma (CETL) is a relatively rare disease and makes up 3–8% of all canine lymphoma and less than 1% of all canine skin tumours.^{1,2} A standard of care has not yet been determined. In veterinary medicine, the most common therapeutic approach is systemic chemotherapy. Corticosteroids and Lomustine (CCNU) are the most commonly used agents, frequently combined with other cytotoxic drugs or L-asparaginase.^{3–8} Results of the treatments have been variable.⁹ Because of the high radiosensitivity of lymphatic cells, radiation therapy has also been used for the treatment of CETL. A case series with 14 dogs with mucocutaneous oral lymphomas treated with radiotherapy showed an overall response rate of 67%. Of these 14 dogs, 6 had T-cell epitheliotropic lymphoma.¹⁰ Recent human studies have also shown promising results.^{4,5}

Masitinib is a tyrosine kinase inhibitor (TKI) targeting KIT receptor and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). It is licensed for the treatment of canine mast-cell tumours and a number of studies have reported its efficacy mainly in dogs with mast-cell tumours.¹¹ Dubreil *et al.* demonstrated that masitinib is very selectively blocking KIT and PDGFR.¹² The same authors also showed that it has a good oral bioavailability and is usually well tolerated.¹² Apart from reversing chemoresistance, masitinib also had a direct mild antiproliferative effect on canine lymphoid cells *in vitro*.¹³ A positive effect of masitinib in a dog with cutaneous T-cell lymphoma has been reported as well as in a few dogs with multicentric T-cell lymphoma (D Jagielski *et al.*, personal communication, 2011).

Considering the possible anticancer effect of masitinib in T-cell lymphoma and especially cutaneous T-cell lymphoma, the aim of this study

Correspondence address:
N. Holtermann
Medizinische Kleintierklinik
Ludwig Maximilians
University Munich
Veterinarstr. 13
80539 Munich
Germany
e-mail:
n.holtermann@web.de

was to evaluate efficacy and side effects of masitinib in dogs with CETL.

Material and methods

Animals

Ten client-owned dogs with histologically diagnosed CETL were prospectively enrolled in this multicenter trial. The patients were presented between August 2009 and September 2011 in the oncology services of the following European clinics: Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Germany; Hofheim Small Animal Clinic, Hofheim/Taunus, Germany; Department Clinical Sciences of Companion Animals, Utrecht University, The Netherlands; Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany.

At their first visit, all dogs underwent a complete physical examination documenting all clinical cutaneous lesions. Staging included abdominal ultrasound, three-view thoracic radiographs, complete blood count (CBC), biochemistry and urinalysis including urine protein creatinine ratio (UP/C). Tumour diagnosis was always confirmed histologically. While on therapy, all dogs were presented every 3 weeks for a physical examination, CBC, biochemistry and urinalysis.

Treatment

Masitinib was administered orally by the owners at a target dosage of 12.5 mg kg^{-1} every day. Adverse events were recorded and graded according to the Veterinary Co-operative Oncology Group-Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) at each visit.¹⁴ In case of an UP/C elevation over two or creatinine or blood urea nitrogen (BUN) 1.5 times higher than the upper reference range or albumin 0.75 times lower than the lower reference range, treatment was discontinued. If a dog developed signs of protein-losing syndrome (UP/C >2, albumin <0.75 lower limit of normal), therapy was interrupted until values had normalized to limit value. If the laboratory values deteriorated, again treatment was permanently discontinued. If hemolytic anaemia [haemoglobin

(Hb) < $10 \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$ and bilirubin > 1.5 upper limit of normal] or anaemia with lack of regeneration (Hb < $10 \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$ and reticulocytes < $80\,000 \mu\text{L}^{-1}$) occurred, treatment was discontinued. In case of hepatic toxicity (alanine aminotransferase (ALT)/aspartate aminotransferase (AST) > 3 upper limit of normal) or neutropenia (< $2000 \mu\text{L}^{-1}$), treatment was interrupted until normalization of values and then resumed at the same dose level. If these events occurred for a second time, treatment was interrupted until resolution and continued at a dose of $9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. If laboratory changes occurred for a third time, a drug holiday was instituted followed by a further dose reduction to $6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. If severe adverse reactions resumed even at this dose, treatment was permanently discontinued. If one of the above-mentioned adverse reactions and/or severe diarrhoea or vomiting persisted after dose reduction, treatment was also permanently discontinued.

Response

Clinical response was assessed every 3 weeks according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST), modified for the evaluation of CETL.¹⁵ If available, the three most dominant lesions were defined as target lesions. The longest diameter of each target lesion was measured using a calliper. The sum of these measurements was used for assessment of response.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) for KIT, PDGF-AA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), PDGF-BB, PDGFR- α , PDGFR- β and stem cell factor (SCF) (all Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) was performed on serial sections of routinely formalin fixed, paraffin embedded tumours from eight dogs after the clinical phase from tissue specimens taken prior to therapy. For two dogs, there was insufficient tissue for IHC testing. Deparaffinization and antigen retrieval were accomplished in the Dako PT Link (Dako, Carpinteria, CA, USA) using a high pH (SCF only) or low pH antigen retrieval solution (both Dako) for 20 min at 99°C . Immunostaining was

performed on the Dako Autostainer Link 48 automated staining system (Dako) using a rabbit polyclonal anti-human KIT antibody (Dako), a goat polyclonal anti-rat PDGF-AA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), a rabbit polyclonal anti-human PDGF-BB, a rabbit polyclonal anti-human PDGFR- α , a rabbit polyclonal anti-human PDGFR- β and a mouse monoclonal anti-human SCF (all Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:100 followed by the Flex detection system with the appropriate secondary antibodies (Dako). The immunoreaction was visualized with 3,3-diaminobenzidine substrate (Dako) and sections were counterstained with haematoxylin. Positive immunohistochemical controls included mast-cell tumours and canine soft tissue sarcoma that had previously been shown to express the targets to which the appropriate antisera were added. For negative controls, the primary antibodies were replaced with homologous non-immune sera. Samples were scored based on the labelling intensity of neoplastic cells and percentage of positive neoplastic cells. Ultimately, tumours were scored as negative when there was no labelling in the examined sections or labelling was only observed in deeper tissue sections or less or equal to 20% of neoplastic cells were positive. Tumours with more than 20% strongly positive cells were scored as positive. A score of weak positive labelling was assigned to tumours that had at least 20% of neoplastic cells with weak positive labelling, but less than 20% of neoplastic cells expressing strong labelling.

Results

Ten dogs were enrolled in this study. The dogs' age ranged from 4 to 15 years, with a median of 10 years. There were two mixed breed dogs and eight pure breed dogs (one Australian shepherd, one German shepherd, one Belgian shepherd, one Picard, one West Highland white terrier, one Gordon setter, one Small Munsterlander and one Collie).

Six of the 10 dogs with CETL received masitinib as first-line therapy for their tumours. One dog was previously treated with a single dosage of steroids, one had been treated with CCNU and prednisolone for over 8 months, one dog had been given L-asparaginase, CCNU, doxorubicin and

prednisolone and in one dog tumour nodules had been repeatedly surgically removed. In 5 of the 10 dogs with CETL, the tumour was generalized. In two dogs, the CETL was located on the lip, in one dog on the nose, the lip and the conjunctivas, in one dog nose, lips and vulva were affected and in one dog in the oral cavity with metastasis to the mandibular lymph node.

Two dogs went into complete remission (CR) and five dogs into partial remission (PR). In three dogs, masitinib was ineffective, and progressive disease (PD) was noted. In one dog, the CR lasted for 126 days. In another one, masitinib was discontinued after 1 year of treatment and the dog was still tumour free 3 years after diagnosis. In both animals, masitinib was the first-line therapy. In the five dogs with PR, median time to progression was 60.5 days (43–84 days). The overall response lasted for median 85 days. The three patients with PD had all been pretreated. One dog had been given a single injection of prednisolone, one had been treated with various chemotherapeutics as listed above and the third one underwent surgery prior to masitinib. Four of the five dogs with PR had untreated CETL before they received masitinib. The fifth dog was pretreated with CCNU and prednisolone. In addition to the seven dogs with tumour remissions on masitinib, one additional dog showed distinctive clinical improvement. This dog first went into PR and had PD 64 days after starting therapy. Despite having PD 64 days after starting therapy, the owner was pleased by the performance of the skin lesions as they were dry and not oozing or itching unlike their appearance before the masitinib treatment. The owner decided to continue administering the medication beyond the study end.

No side effects of masitinib were observed in 4 of the 10 dogs. As summarized in Table 1, the side effects noticed in the remaining six dogs were classified as mostly mild to moderate. An exception was one dog that developed grade 4 diarrhoea, grade 3 vomiting and anorexia as well as moderate hypoalbuminemia. This dog was euthanized due to diarrhoea.

Immunohistochemical examination for KIT, SCF, PDGFR- α / β PDGF-AA/-BB was possible in 8 of the 10 cases. One (with PD) of these eight dogs was pretreated with a single injection of

4 N. Holtermann *et al.***Table 1.** Side effects of masitinib in dogs with CETL treated with masitinib

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Anaemia (Hb ↓)	2/10	1/10	–	–	–
Neutropenia	1/10	–	–	–	–
Plt ↓	1/10	–	–	–	–
ALT ↑	–	–	1/10	–	–
AP ↑	–	1/10	–	–	–
Alb ↓	–	1/10	–	–	–
Creatinine	1/10	–	–	–	–
Anorexia	–	–	1/10	–	–
Vomiting	–	–	–	1/10	–
Diarrhoea	–	–	–	1/10	–
Weight loss	–	1/10	–	–	–
Petechiae	–	–	1/10	–	–

Alb, albumin; AP, alkaline phosphatase; Hb, haemoglobin; Plt, platelets.

prednisolone before biopsies were taken. The other seven dogs did not receive any chemotherapy or steroids before specimens were taken. In two dogs (one with CR, one with PD), no tumour specimens were available for immunohistochemical evaluation. It was initiated after the clinical phase to get a better understanding of the mechanisms of action of masitinib in CETL. Table 2 summarizes the results. All samples were negative for KIT. Three specimens stained negative for SCF (both PD dogs and one PR). In the other five cases, there was a strong positive reaction for SCF. PDGFR- α was tested negative in one dog with PR. The dog in CR as well as one in PR stained weakly positive for the receptor. Both dogs with PD and the remaining three in PR were strong positive. PDGFR- β was negative in all dogs except in one with PR. The specimens of three dogs with PR tested weakly positive for PDGF-AA. The other two PR samples as well as those of the two dogs with PD and the

one in CR showed no expression of the growth factor.

Discussion

According to our study, the overall clinical response rate of 70% supports that masitinib has promising potential in treating CETL. This is in contrast to the observations by London *et al.* (2003) who used a different TKI (SU11654) in six dogs with CETL of which only one experienced a stable disease (SD).¹⁶ The observed response rate in our study is comparable to that reported in studies using cytotoxic chemotherapy, in which measurable responses were achieved in 78 and 83%, respectively.^{7,8} In the study of Williams *et al.* response to CCNU lasted for median 106 days while the median time to progression of 85 days in our study is similar to the results of Risbon *et al.* who reported a median response duration of 86 days.^{7,8} Vail *et al.* treated nine dogs with

Table 2. Immunohistochemistry of CETL prior to treatment with masitinib

Response	Prior treatment	SCF	KIT	PDGF-AA	PDGF-BB	PDGFR- α	PDGFR- β
CR	None	Strong pos.	No labelling	No labelling	No labelling	Weak pos.	No labelling
PR	None	Strong pos.	No labelling	No labelling	Strong pos.	Strong pos.	Strong pos.
PR	None	Strong pos.	No labelling	Weak pos.	Strong pos.	Strong pos.	No labelling
PR	None	Strong pos.	No labelling	No labelling	No labelling	No labelling	No labelling
PR	None	Strong pos.	No labelling	No labelling	No labelling	Strong pos.	No labelling
PR	None	Strong pos.	No labelling	Weak pos.	No labelling	Weak pos.	No labelling
PD	Prednisolone (single injection)	No labelling	No labelling	No labelling	No labelling	Strong pos.	No labelling
PD	None	No labelling	No labelling	No labelling	Weak pos.	Strong pos.	No labelling

pos., positive.

CETL with pegylated liposomal doxorubicin, but with an overall response rate of 44%, this approach seems to be less effective than masitinib.¹⁷ The study of Iwamoto *et al.* using linoleate to treat dogs with CETL showed clinical improvement and reduction or disappearance of lesions in six of eight dogs; however, there was no definition of CR and PR as well as stable and PD, so this study should be interpreted with caution.¹⁸ Pegylated L-asparaginase used in seven dogs with CETL led to a median survival of 9 months but responses were only partial and often short lived.³

All except for one dog responding to masitinib did not receive any prior therapy and all three dogs with PD were pretreated, which might indicate that prior treatment may limit the efficacy of masitinib. Similar results are found in the study of Hahn *et al.*¹¹ It could not be determined if this was owing to changes in the expression of growth factor receptors and their growth factors because IHC was only performed on specimens taken prior to any therapy. In many neoplasms, it has been shown by various mechanisms cytotoxic drugs have the potential to either induce drug resistance or select for resistant subclones. Cancer cells can acquire a multidrug resistant (MDR) phenotype after exposition to one specific drug leading to cross-resistance to other structurally and functionally unrelated anticancer drugs.^{19,20} In human leukaemia cell lines, it has been demonstrated that tumour cells can experience an up-regulation of MDR-1 as a result of treatment with a cytotoxic drug (e.g. an anthracycline) most likely resulting in cross-resistance to the TKI imatinib.²¹ However, Zandvliet *et al.* have proven that masitinib can reverse doxorubicin resistance in canine lymphoid cell lines.¹³ But no investigations have yet been made for the combined use of masitinib and doxorubicin *in vivo*. Several lines of evidence – predominantly in human medicine – have shown that besides acquired resistance to TKIs several malignancies could show a ‘*de novo*’ resistance which leads to failure of a therapy that should have been effective according to the underlying biology and genetics of the tumour.²² In the current study, no investigations have been made according to tumour kinase mutational status. In canine mast-cell tumours, most c-kit mutations have been identified in exon 11,

but also in exons 7 and 8, as well as exon 17.^{23,24} In human, gastrointestinal stromal tumours with KIT mutations in exon 11 have a higher response rate than those with exon 9 mutations or those without KIT or PDGFRA mutations.²⁵ Because all except for one specimen in this study showed weak to strong PDGFR- α expression, the observed responses could have been caused by their diverse mutational status.

Masitinib inhibits mainly the receptors KIT and PDGFR. Therefore, the immunohistopathological examination of the samples for these receptors and their corresponding factors should elucidate if these targets and their activating factors were present in the samples.

Activation of KIT is considered of paramount importance for proliferation, survival and differentiation of haematopoietic progenitor cells into mature cells. In human haematopoietic tumours, KIT is predominantly expressed by undifferentiated tumours of the progenitor cells and only rarely by those involving mature haematopoietic cells. These observations were recently confirmed in veterinary medicine by studies of Giantin *et al.* who evaluated KIT expression in canine lymphoma and leukemias. KIT mRNA reached significant levels only in some blastic (high grade) T-cell lymphomas and undifferentiated leukemias.²⁶ In dogs with CETL, significant KIT expression has only infrequently been reported.²⁷ In humans, KIT expression is present in only 30–50% of all cases of cutaneous lymphoma.²⁸ Another study examining 168 CD30+ lymphomas including 15 cutaneous anaplastic large-cell lymphomas found KIT expression to be exceedingly rare.²⁹ In this study, KIT receptor expression was found to be negative in all dogs tested. It is therefore concluded that KIT does not play a significant role in the pathogenesis of most canine CETL.

Besides inhibiting the KIT and PDGFR α/β receptors masitinib also targets other receptors and pathways such as lymphocyte-specific kinase (Lck), Lck/Yes-related protein (LYn), fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) and focal adhesion kinase (FAK).³⁰ It is speculative if these pathways serve as targets in the masitinib effects on CETL. It is an interesting observation that in our study all except of one dog responding to masitinib reacted strongly positive for SCF, while SCF was negative

6 N. Holtermann *et al.*

in the two dogs with PD. One dog with PD was pretreated with a single injection of prednisone before biopsies were taken. Therefore, it may be possible that SCF expression in this case was changed by the prior therapy which could have a negative impact on the efficacy of masitinib. SCF has the potential to synergize with other growth factors and thus gain influence on the phosphorylation of the EPO receptor and the beta chain of interleukin-3 receptor.^{31–34} Lck together with other receptors has been shown in humans to play a role in apoptosis of lymphomas.³⁵ Further studies are needed to elucidate the impact of SCF and Lck as well as other non-KIT/non-PDGFR signalling pathways in the development of CETL and the possible effect masitinib may exert on these pathways.

PDGFR- β represents another potential target of masitinib but in our study showed strong expression in only one of eight dogs (PR). In all the other dogs, there was no or only very little PDGFR- β expression detected. It was expected that because of the inflammatory nature of epitheliotropic lymphomas, the expression level of PDGFR- β would be higher, because PDGFR- β can be upregulated by inflammatory or other stimuli while it is low in cells under physiological circumstances.³⁶ Based on our results, it has to be assumed that this receptor and its substrate do not play an important role in CETL, especially since the case with CR stained negative for both PDGF-BB and PDGFR- β .

PDGFR- α binds to all PDGF ligands and was found to be strongly positive in five dogs (three PR, two PD) and weakly positive in other two dogs (one CR, one PR). It is conceivable that masitinib may exert some effects on this receptor, but PDGF- α was also strongly positive in both dogs with PD which questions the impact of masitinib on the PDGFR- α pathway. A limitation of our study is that only two of three known PDGF receptors and two of five ligands were evaluated. Especially PDGF-AB was not evaluated in this study, although PDGF-AB can give stronger mitotic and chemotactic effects than PDGF-AA and -BB.^{37,38} However, this effect occurs only in cells with the same amount of α - and β -receptors, which was only seen in one dog in which strong expression of both receptors could be demonstrated.

Besides measureable responses, palliation of tumour-associated symptoms is an important factor in veterinary medicine. One of the patients in this study developed PD after 2 month on masitinib, but the lesions remained dry and non-irritated with masitinib in contrast to prior treatment which led the owner to keep on administering masitinib. Fontaine *et al.* reported that 40% of dogs with CETL are presented with pruritus, and erosions and crusts occur in 60 and 46.6%, respectively.³⁹ In many cases, the clinical symptoms associated with the skin lesions are most irritating to the patient and may prompt owners to consider euthanasia. Therefore, patients may benefit from masitinib treatment by palliation of their clinical symptoms without tumour remission. Masitinib has also been proven effective in the treatment of canine atopic dermatitis.⁴⁰ Toceranib, another TK inhibitor approved for the use in dogs, has been reported to lead to clinical benefit in tumours that are often associated with inflammatory reactions (e.g. anal gland anal sac adenocarcinomas), poorly differentiated carcinoma (neck and jaw) and canine nasal adenocarcinoma.^{41,42} It has been suggested that the antiangiogenic properties of toceranib from targeting VEGFR may be responsible for this effect, but the exact mechanisms of action on non-KIT-driven neoplasms are yet to be elucidated. Therefore, based on these preliminary observations, it can be hypothesized that TK inhibitors may exert mechanisms that target tumours with inflammatory components, such as CETL.

There were mainly only a few and mainly mild side effects which was to be expected based on the data of Hahn *et al.*¹¹ However, one dog with severe diarrhoea as a side effect of masitinib had to be euthanized. By combining masitinib with other established therapies like cytotoxic chemotherapy, surgery or radiation therapy, additive or synergistic effects may be achieved.^{7–9,43–45} There are no published data in veterinary medicine on multimodality approaches to CETL which include TKIs. In human patients with epitheliotropic T-cell lymphoma, combined modality therapy has been shown to result in higher rates of complete responses.⁴⁶

In conclusion, masitinib seems to have efficacy in CETL. From the limited data available, it appears

that in our cases inhibition of KIT and PDGFR did not play an important role in the clinical remissions observed. However, these preliminary results need to be interpreted with caution because of the limitations of this study, given the fact that only a heterogeneous, small and not placebo-controlled group of patients was treated. Therefore, further investigations are needed to substantiate our findings and elucidate the pathways by which masitinib acts against CETL.

Acknowledgements

We thank AB Science, 3, Avenue George V, Paris 75008, France for providing free Masivet® for this study.

References

- Blackwood L. Tumours of the skin and subcutaneous tissues. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. J Dobson and DX Lassalle Eds., Gloucester, Wiley & Sons, 2011: 152–155.
- Goldschmidt MH and Shofer FS. *Skin Tumors of the Dog and Cat*. Oxford, Pergamon Press, 1992.
- Moriello KA, MacEwen EG and Schultz KT. PEG-L-asparaginase in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma and histiocytic proliferation dermatitis. In: *Advances in Veterinary Dermatology*. PJ Ihrke, IS Mason and SD White Eds., Oxford, Pergamon Press, 1993: 293–299.
- Kamstrup MR, Lindahl LM, Gniadecki R, Iversen L, Skov L, Petersen PM, *et al.* Low-dose total skin electron beam therapy as a debulking agent for cutaneous T-cell lymphoma: an open-label prospective phase II study. *Br J Dermatol* 2012; **166**: 399–404.
- Hauswald H, Zwicker F, Rochet N, Uhl M, Hensley F, Debus J, *et al.* Total skin electron beam therapy as palliative treatment for cutaneous manifestations of advanced, therapy-refractory cutaneous lymphoma and leukemia. *Radiat Oncol* 2012; **7**: 118.
- de Lorimier LP. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; **36**: 213–228.
- Risbon RE, de Lorimier LP, Skorupski K, Burgess KE, Bergman PJ, Carreras J, *et al.* Response of canine cutaneous epitheliotropic lymphoma to lomustine (CCNU): a retrospective study of 46 cases (1999–2004). *J Vet Intern Med* 2006; **20**: 1389–1397.
- Williams LE, Rassnick KM, Power HT, Lana SE, Morrison-Collister KE, Hansen K, *et al.* CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. *J Vet Intern Med* 2006; **20**: 136–143.
- Hoppe RT, Harvell JD and Kim YH. Mycosis fungoides. In: *Non-Hodgkin's Lymphomas*. PM Mauch, JO Armitage and NL Harris Eds., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 307–331.
- Berlato D, Schrempp D, Van Den Steen N and Murphy S. Radiotherapy in the management of localized mucocutaneous oral lymphoma in dogs: 14 cases. *Vet Comp Oncol* 2012; **10**: 16–23.
- Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008; **22**: 1301–1309.
- Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, Gros L, Humbert M, Casteran N, *et al.* Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One* 2009; **4**: e7258.
- Zandvliet M, Teske E, Chapuis T, Fink-Gremmels J and Schrickx JA. Masitinib reverses doxorubicin resistance in canine lymphoid cells by inhibiting the function of P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther* 2013; **36**: 583–587.
- Veterinary Co-operative Oncology Group. Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncol* 2004; **2**: 195–213.
- Therasse P, Arbus SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 205–216.
- London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, *et al.* Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 2755–2768.
- Vail DM, Kravis LD, Cooley AJ, Chun R and MacEwen EG. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **39**: 410–416.
- Iwamoto KS, Bennett LR, Norman A, Villalobos AE and Hutson CA. Linoleate produces remission in canine mycosis fungoides. *Cancer Lett* 1992; **64**: 17–22.
- Kruh GD and Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003; **22**: 7537–7552.

20. Haimeur ACG, Deeley RG and Cole SP. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004; **5**: 21–53.
21. Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; **101**: 2368–2373.
22. Garraway LA and Jänne PA. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov* 2012; **2**: 214–226.
23. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmerini F, Leventhal PS, Guery S, *et al.* Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res* 2008; **6**: 1137–1145.
24. Pryer NK, Lee LB, Zadovaskaya R, Yu X, Sukbuntherng J, Cherrington JM, *et al.* Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 5729–5734.
25. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, *et al.* Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 4342–4349.
26. Giantin M, Aresu L, Aricò A, Gelain ME, Riondato F, Comazzi S, *et al.* Evaluation of tyrosine-kinase receptor c-kit mutations, mRNA and protein expression in canine lymphoma: might c-kit represent a therapeutic target? *Vet Immunol Immunopathol* 2013; **154**: 153–159.
27. Shiomitsu K, Bauer RW, Grasperge BJ, Suter SE and Waite KJ. Cutaneous epitheliotropic lymphoma with dual CD3 and c-kit expression in a dog. *Vet Clin Pathol* 2012; **41**: 594–598.
28. Brauns TC, Schultewolter T, Dissemont J, Maschke J and Goos M. C-KIT expression in primary cutaneous T-cell lymphomas. *J Cutan Pathol* 2004; **31**: 577–582.
29. Rassidakis GZGG, Oyarzo M, Younes A and Medeiros LJ. Lack of c-kit (CD117) expression in CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol* 2004; **17**: 946–953.
30. Marech I, Patruno R, Zizzo N, Gadaleta C, Introna M, Zito AF, *et al.* Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? Critical reviews in oncology/hematology. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; **91**: 98–111.
31. Jacobs-Helber SM, Penta K, Sun Z, Lawson A and Sawyer ST. Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6850–6853.
32. Sui X, Krantz SB, You M and Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 1998; **92**: 1142–1149.
33. Wu H, Klingmuller U, Besmer P and Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995; **377**: 242–246.
34. Liu L, Cutler RL, Mui AL and Krystal G. Steel factor stimulates the serine/threonine phosphorylation of the interleukin-3 receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16774–16779.
35. Paterson J, Tedoldi S, Craxton A, Jones M, Hansmann M, Collins G, *et al.* The differential expression of LCK and BAFF-receptor and their role in apoptosis in human lymphomas. *Haematologica* 2006; **91**: 772–780.
36. Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, Larsson E, Ronnstrand L, Klareskog L, *et al.* Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet* 1988; **1**: 1353–1356.
37. Rupp E, Siegbahn A, Ronnstrand L, Wernstedt C, Claesson-Welsh L and Heldin CH. A unique autophosphorylation site in the platelet-derived growth factor alpha receptor from a heterodimeric receptor complex. *Eur J Biochem* 1994; **225**: 29–41.
38. Heidaran MA, Pierce JH, Yu JC, Lombardi D, Artrip JE, Fleming TP, *et al.* Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20232–20237.
39. Fontaine J, Heimann M and Day MJ. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol* 2010; **21**: 267–275.
40. Cadot P, Hensel P, Bensignor E, Hadjaje C, Maignac G, Beco L, *et al.* Masitinib decreases signs of canine atopic dermatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Vet Dermatol* 2011; **22**: 554–564.
41. London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, *et al.* Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Vet Comp Oncol* 2012; **10**: 194–205.
42. Bernabe L, Portela R, Nguyen S, Kisseberth W, Pennell M, Yancey M, *et al.* Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Vet Res* 2013; **9**: 190.

43. Rosenthal RC and MacEwen EG. Treatment of lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990; **196**: 774–781.
44. Wilcock BP and Yager JA. The behavior of epidermotropic lymphoma in twenty-five dogs. *Can Vet J* 1989; **30**: 754–756.
45. Wilson LD, Jones GW and Kacinski BM. Cutaneous T-cell lymphomas. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. VTJ DeVita, S Hellman and SA Rosenberg Eds., Philadelphia, JB Lippincott, 2001: 2316–2330.
46. Apisarnthanarax N, Talpur R and Duvic M. Treatment of cutaneous T cell lymphoma: current status and future directions. *Am J Clin Dermatol* 2002; **3**: 193–215.

IV. DISKUSSION

1. Der Tyrosinkinaseinhibitor Toceranib bei feline Injektionsstellen-assoziierten Sarkomen

In der hier aufgeführten Studie wird der TKI Toceranib zum ersten Mal bei Katzen angewendet und seine Effektivität sowie seine Nebenwirkungen bei der Behandlung von FISS evaluiert. Es konnte kein klinisches Ansprechen verzeichnet werden. Aufgrund der Studien von KATAYAMA und Kollegen sowie LAWRENCE und Kollegen hätte etwas anderes erwartet werden können. KATAYAMA et al. veröffentlichten 2004 vielversprechende Ergebnisse zur Behandlung von FISS mit Imatinib in vitro und in vivo (KATAYAMA et al., 2004). LAWRENCE et. al wiesen die antiproliferative und proapoptotische Wirkung von Masitinib in FISS-Zelllinien nach (LAWRENCE et al., 2012). Die große Zahl an Katzen (11/14), die in der hier aufgeführten Studie trotz Therapie ein Fortschreiten des Tumorwachstums (*progressive disease* (PD)) zeigten, könnte durch die Größe der Tumoren bedingt sein. Mit einem längsten Durchmesser von median 6,1 cm wurden die Katzen mit relativ großen Tumoren vorgestellt, was eine Resektion unmöglich machte. Zusätzlich stellten sich einige Tumoren (7/18) bereits von fluktuierender und nicht der für Sarkome typischen derben Konsistenz dar. Dies kann potenziell ein Zeichen von zentraler Nekrose sein, die durch eine verminderte Blutzirkulation im Tumor hervorgerufen wird, was dann auch wiederum eine geringere Wirkstoffkonzentration im Tumor bedingen könnte.

Die Patientenselektion dieser Studie war relativ inhomogen, da sowohl Primärtumoren als auch Rezidive eingeschlossen wurden. Zusätzlich handelte es sich bei 2 Tumoren nicht um Fibrosarkome, sondern um ein Myxo- und ein Myxofibrosarkom. Da jedoch kein Unterschied im Ansprechen auf die Therapie bestand, wurde von einem Ausschluss dieser Tiere abgesehen.

Die Tumoren wurden alle 3 Wochen neu vermessen. Dieser für das in der Regel eher langsame Wachstum von Sarkomen kurze Zeitraum könnte Grund für die bei vielen Patienten zunächst verzeichnete unveränderte Größe der Tumoren (*stable disease* (SD)) gewesen sein. Die einzige Katze, die über die 85 Tage des Studienzeitraums hinaus in SD blieb, war die, die 3 Monate vor Beginn der

Toceranib-Therapie palliativ bestrahlt wurde, so dass das Tumorwachstum noch durch die Strahlentherapie verlangsamt gewesen sein könnte. Allerdings wurde diese Katze, deren Tumor in der Interskapularregion der Wirbelsäule aufsaß, 2 Monate später aufgrund einer Paraparese euthanasiert. Da keine pathologische Untersuchung und auch vorher nie eine computertomographische Untersuchung durchgeführt wurde, kann nur spekuliert werden, dass der Tumor möglicherweise ins Rückenmark eingebrochen ist. Differentialdiagnostisch müssen jedoch auch Nebenwirkungen der Strahlentherapie bedacht werden. Die 3 Durchmesser aller Tumoren wurden lediglich mittels Messschieber bestimmt, eine computertomographische Messung hätte sicherlich deutlich genauere und reproduzierbarere Ergebnisse geliefert. Doch es ist eine kostenintensive Untersuchung, die auch bedeutet hätte, dass die Studientiere alle 3 Wochen in Narkose hätten gelegt werden müssen.

Bisher gibt es keine Studien zur Pharmakodynamik und -kinetik von Toceranib bei Katzen. Die 2009 von BELLAMY und Kollegen veröffentlichte Studie zur Pharmakokinetik von Masitinib zeigte, dass wie beim Hund ein Dosispeak nach 2 Stunden zu verzeichnen ist, die maximale Blutkonzentration jedoch geringer als beim Hund ausfällt (BELLAMY et al., 2009). Es bleibt zu vermuten, dass bei Toceranib ähnliche Parallelen zwischen Hund und Katze gezogen werden können. Da in der hier aufgeführten Studie keine Untersuchungen bezüglich der Wirkstoffkonzentrationen vorgenommen wurden, ist unklar, ob ausreichende Konzentrationen erreicht werden konnten. Sowohl eine zu niedrige Wirkstoffkonzentration als auch eine beeinträchtigte Rezeptorbindung könnten Grund für die hohe Zahl an Katzen sein, die kein Ansprechen auf die Therapie zeigten. LAWRENCE et al. vermuteten in ihrer Studie, dass die zum Erreichen der Konzentration, die das Wachstum der FISS-Zellen um 50 % inhibieren (IC_{50}), nötige Dosierung zu toxisch für feline Patienten sein könnte (LAWRENCE et al., 2012). Somit ist es möglich, dass die hier verwendete, überwiegend gut tolerierte Dosis von Toceranib zu nur ineffektiven Wirkstoffkonzentrationen führte.

Toceranib inhibiert nachweislich die Phosphorylierung mehrerer zur Familie der Splitkinasen gehörige Rezeptor-Tyrosinkinasen, nämlich Kit, VEGFR2 und PDGFR- β (LONDON et al., 2003). Alle in der hier beschriebenen Studie untersuchten Tumorproben wiesen eine positive (14/15) bzw. schwach positive (1/15) Expression des PDGFR auf. Allerdings konnte nur bei 4 der Proben eine

zusätzlich positive, bei 2 weiteren eine schwach positive Reaktion von PDGF nachgewiesen werden. KATAYAMA et al. wiesen in ihrer 2004 veröffentlichten Studie bereits nach, dass PDGFR- β sowohl das Zellwachstum von Vakzine-assoziierten Sarkomzellen beeinflusst, als auch einen vor Apoptose-schützenden Effekt aufweist (KATAYAMA et al., 2004). Da die Studie beweisen konnte, dass PDGFR- β in Anwesenheit von PDGF-BB autophosphoryliert wird, wäre zumindest in den 6 Tumoren, die eine gleichzeitige Expression von Wachstumsfaktor und Rezeptor aufwiesen, eine positive Wirkung des Toceranibs zu erwarten gewesen. Zwei dieser Katzen blieben in SD, wobei eine der beiden diejenige war, die vor der medikamentösen Therapie bestrahlt wurde. Die damit mögliche Fehlinterpretation des Ansprechens wurde im vorangegangenen Text bereits diskutiert. Die zweite Katze wurde aufgrund der an Tag 21 gemessenen hochgradigen ALT-Erhöhung nicht weiter therapiert, so dass sie nicht zur Beurteilung des Ansprechens herangezogen werden kann. Die 4 weiteren Tiere, deren Tumoren sowohl PDGF als auch PDGFR exprimierten, zeigten ein progressives Tumorwachstum, so dass es fraglich erscheint, ob dieser Wachstumsfaktor und sein Rezeptor tatsächlich eine entscheidende Rolle bei FISS spielen. In der Humanmedizin weiß man, dass der überwiegende Teil der, dem FISS in manchen Aspekten ähnlichen Dermatofibrosarcoma protuberans eine chromosomale Abnormalität aufweist, die zu einer auto- oder parakrinen Aktivierung des PDGFR und dadurch letztlich zur Zellproliferation führt (SHIMIZU et al., 1999; SIMON et al., 2001). Dadurch konnten selbst bei inoperablen oder metastasierten Erkrankungen gute Erfolge mit dem TKI Imatinib erzielt werden (WANG et al., 2015). Es bleibt zu untersuchen, ob in feline Tumoren ähnliche chromosomale Veränderungen vorliegen. In der Immunhistochemie konnte bei 11 Biopsien eine gleichzeitige Expression von VEGF und VEGFR, einem weiteren Angriffspunkt von Toceranib, nachgewiesen werden. Allerdings fiel die Reaktion bei 6 dieser Proben nur schwach positiv aus. Eine Untersuchung von 24 caninen Fibrosarkomen konnte den Wachstumsfaktor sowie seinen Rezeptor VEGFR-2 in 22 Fällen nachweisen, so dass hier eine autokrine Funktion von VEGF in der Tumorentstehung vermutet wird (AL-DISSI et al., 2009). Möglicherweise hätte die Aufspaltung der IHC in einer Untersuchung auf VEGFR-1 und -2 mehr Aufschluss über die Aktivität des Wachstumsfaktor in FISS geben können, da man aus der Humanmedizin weiß, dass nur VEGFR-2 einen proangiogenetischen Effekt hat (FERRARA, 2001).

Drei der 5 Katzen mit einem positiven (nicht schwach positiven) Nachweis von sowohl VEGF als auch VEGFR zeigten ein progressives Tumorwachstum, 2 an Tag 21, eine an Tag 43, bei einer musste die Therapie aufgrund der hochgradigen ALT-Erhöhung beendet werden. Die fünfte war wiederum die Katze, die bereits vor TKI-Therapie bestrahlt worden war, so dass auch hier wieder die Korrelation zwischen IHC-Ergebnis und Ansprechen auf die Therapie mit Vorsicht interpretiert werden muss. In keiner der FISS-Biopsien dieser Studie konnte Kit nachgewiesen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten SMITH et al. ebenfalls. In ihrer Studie zeigten 74 % der Tumoren keine Immunoreaktivität hinsichtlich Kit, in weiteren 17 % der Proben zeigten weniger als 10 % der Zellen positive Reaktion (SMITH et al., 2009).

Art und Schweregrad der in dieser Studie aufgetretenen Nebenwirkungen entsprechen in etwa derer, die auch bei Hunden dokumentiert wurden. Die hier am häufigsten verzeichnete Nebenwirkung Anorexie, die bei 10 der 18 Katzen auftrat, wurde auch in den an Hunden durchgeführten Untersuchungen verzeichnet (LONDON et al., 2003; LONDON et al., 2009; BERNABE et al., 2013). In beiden Tierarten waren diese Nebenwirkungen in der Regel jedoch nur mild (Grad 1) ausgeprägt. In der hier aufgeführten Studie war die Anorexie bei einer der Katzen mit einem Gewichtsverlust um 11,2 % (Grad 2) assoziiert. Bei dieser konnte allerdings zusätzlich eine Grad-4-ALT-Erhöhung, eine Grad-1-Hypalbuminämie sowie eine Erhöhung des Urin-Protein/-Kreatinin-Quotienten gemessen werden, so dass die Gewichtsreduktion multifaktoriell bedingt gewesen sein könnte. Es wurde eine Therapiepause angeraten, doch die Besitzer entschieden sich die Medikamentengabe aus monetären Gründen vollständig einzustellen. Die Katze wurde auch nicht mehr zu einer Kontrolle der Werte vorgestellt. Bei 9 der 10 Katzen war diese vorübergehende Futterverweigerung nicht mit anderen klinischen oder labordiagnostischen Auffälligkeiten assoziiert, so dass keine Interventionen nötig wurden. Alle 9 zeigten nach wenigen Tagen wieder normale Fressgewohnheiten. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass eine dieser Katzen eine Bissverletzung erlitt und in Folge dieser eine reduzierte Futteraufnahme zeigte, so dass nicht differenziert werden kann, ob das Trauma oder die TKI-Therapie die Symptomatik verursachte. Eine weitere Katze verlor 13,6 % ihres Körpergewichts bei ungestörter Futteraufnahme. Da dieses Tier ein deutlich progressives Tumorwachstum zeigte, ist es möglich, dass es sich hier um

Tumorkachexie handelte. Allerdings berichten auch LONDON und Kollegen, dass bei 14,9 % der von ihnen mit Toceranib behandelten Hunde ein Gewichtsverlust zu verzeichnen war. Die Ursache des Gewichtsverlustes der betroffenen Katze kann letztlich nur vermutet werden, da die Therapie aufgrund der PD beendet wurde. Mit einem Anteil von 31,6 % stimmt das Auftreten von gering- bis mittelgradiger Lethargie mit den Zahlen vorangegangener Studien ungefähr überein. BERNABE et al. berichten von 32,5 %, LONDON et al. von 35,6 % der Hunde, die ein reduziertes Allgemeinbefinden entwickelten. In der Studie von YANCEY et al. konnte gezeigt werden, dass 92 % eines radioaktivmarkierten Toceranibs, nämlich [¹⁴C]-Toceranib, bei caninen Patienten mit dem Kot ausgeschieden werden, nur 7 % konnten im Urin nachgewiesen werden, was durch eine vorwiegend hepatische *clearance* bedingt ist (YANCEY et al., 2010a; YANCEY et al., 2010b). Da bisher dahingehend keine Studien bei Katzen erfolgten, kann nur vermutet werden, dass der Wirkstoff bei dieser Tierart ähnlich metabolisiert wird, was wiederum die bei 4 Patienten (22,2 %) aufgetretene hochgradige ALT-Erhöhung erklären könnte. LONDON und Kollegen berichten von 21 Hunden (24,1 %) mit ALT-Erhöhung, wobei nur einer der Patienten eine Grad 4-Erhöhung aufwies (LONDON et al., 2009). Eine frühere Studie, die ebenfalls von LONDON et al. durchgeführt wurde, zeigte bei 2 der 47 behandelten Hunde eine ALT-Erhöhung ohne damit zusammenhängender spezifischer Symptome, die ohne jegliche Intervention wieder sank (LONDON et al., 2003). In der Studie von BERNABE et al., in der die Effektivität niedrigerer Dosierungen des Toceranibs untersucht wurde, kam es bei 9 von 40 Hunden zu einer Erhöhung des Leberenzym, bei 2 der Tiere war sie Grad 3 bzw. 4 entsprechend erhöht (BERNABE et al., 2013). Aufgrund des vergleichsweise höheren Anteils schwerwiegender ALT-Erhönungen könnte eine ausgeprägtere Hepatotoxizität des TKI bei Katzen vermutet werden. Zur letztlichen Klärung müssten jedoch weitere Studien hinsichtlich der Pharmakokinetik und -dynamik mit größeren Patientenzahlen erfolgen. Der Stammzellfaktorrezeptor Kit wird physiologisch von hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert (BESMER, 1991), so dass eine Zytopenie, wie die bei 5 Katzen (27,8 %) gemessene milde Neutropenie bzw. Lymphozytopenie zu erwarten waren. LONDON et al. berichten allerdings von einer höheren Inzidenz (46,0 %) an Neutropenien (LONDON et al., 2009). Mit Dosierungen zwischen 2,35 und 2,89 mg/kg jeden zweiten Tag wie BERNABE et al. sie anwendeten,

traten ähnliche Zellzahlreduktionen auf. Zwanzig der 40 Hunde entwickelten eine milde, ein weiterer eine moderate Neutropenie (BERNABE et al., 2013). Dies lässt vermuten, dass Toceranib bei feline Patienten eine weniger ausgeprägte myelosuppressive Wirkung aufweist, als es bei Hunden der Fall ist. Nur eine der 18 Katzen entwickelte milde, selbstlimitierende Diarrhoe, was mit Ausnahme der Anorexie die einzige gastrointestinale Nebenwirkung blieb. Im Gegensatz dazu führte Toceranib bei etwa der Hälfte der Hunde, also bei 52,5 % der von BERNABE et al. und bei 46 % der von LONDON et al. behandelten Hunde zu Diarrhoe (LONDON et al., 2009; BERNABE et al., 2013). In letztgenannter Studie führte die Therapie bei 12,6 % der Tiere sogar zu Hämatochezie, gastrointestinalen Blutungen und/oder hämorrhagischer Diarrhoe (LONDON et al., 2009). Dabei muss beachtet werden, dass es sich dabei um häufige paraneoplastische Syndrome von Mastzelltumoren handelt, der Neoplasie, die in dieser Studie behandelt wurde. Somit kann nicht sicher differenziert werden, ob diese Symptome medikamenteninduziert oder durch die Grundkrankheit bedingt waren. Allerdings führte das Medikament bereits in der Dosisfindungsstudie von 2003, bei der Hunde mit verschiedensten Tumorerkrankungen behandelt wurden, zu milden bis moderaten gastrointestinalen Nebenwirkungen, wenn es täglich verabreicht wurde. Diese Symptome persistierten in einzelnen Fällen trotz supportiver Therapie, was die Arbeitsgruppe am ehesten auf anhaltende Wirkstoffspiegel des SU11654 zurückführte (LONDON et al., 2003). Da die gastrointestinale Schleimhaut auch durch andere Wirkstoffe, wie Nichtsteroidale Antiphlogistika oder Kortisonpräparate, sehr sensibel reagiert und schnell geschädigt werden kann, vermuten die Autoren der oben aufgeführten Studie, dass auch die durch Toceranib hervorgerufene Mukosaschädigung durch eine Beeinträchtigung der Blutversorgung der Schleimhaut bedingt ist. Doch, so postulieren die Autoren weiter, auch eine Dysfunktion der Kit-abhängigen Kajal-Zellen könnte zu einer Hypermotilität und letztlich zu Diarrhoe führen (LONDON et al., 2003). Bei einer der 18 inkludierten Katzen wurden in der Vergangenheit geringgradige Azotämien gemessen. Da zum Zeitpunkt des Studienbeginns die Nierenwerte in dem für die Studie vorgegebenen Bereich lagen, wurde die TKI-Therapie begonnen. Diese Katze entwickelte eine Woche nach Beginn der Tablettengabe eine Grad-2-Kreatininerhöhung, die jedoch bereits eine weitere Woche später wieder auf die initialen Werte absank. Nichtsdestotrotz wurde die Dosierung um 36% auf 2,4mg/kg reduziert. An Tag 42 konnten letztlich sogar

niedrigere Werte als vor Beginn der Medikation gemessen werden. Auch 4 der 47 Hunde der Dosisfindungsstudie von LONDON und Kollegen entwickelten eine Azotämie durch die SU11654-Therapie, wobei betont werden muss, dass alle diese Tiere an Vorerkrankungen litten, die diese Laborveränderungen ebenfalls bedingt haben können. Und ähnlich wie auch bei den hier behandelten Katzen kam es zu keiner Verschlechterung der Werte im Laufe der TKI-Therapie (LONDON et al., 2003). Die eine der 18 Katzen, der Toceranib täglich, anstatt alle 2 Tage verabreicht wurde, zeigte in den ersten 5 Tagen der Therapie eine deutlich reduzierte Futteraufnahme, präsentierte sich danach jedoch sowohl den Besitzern als auch in den Kontrolluntersuchungen wieder von ungestörtem Allgemeinbefinden. Aufgrund von PD wurde die Therapie an Tag 21 beendet. Es kann somit nur vermutet werden, dass die tägliche Applikation von Toceranib von Katzen, zumindest über einen kurzen Zeitraum, gut toleriert wird. Wobei auch hier für eine konkrete Schlussfolgerung Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen nötig sind. Acht der 10 Hunde, die Toceranib täglich erhielten, entwickelten Anorexie, 50 % Diarrhoe (LONDON et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass Katzen eine bessere Verträglichkeit gegenüber frequenteren Applikationsintervallen aufweisen. Ob dies durch eine schnellere Metabolisierung bedingt ist, bleibt zu klären. Allerdings geht aus der Studie von LONDON et al. nicht hervor, zu welchem Zeitpunkt der Therapie die beschriebenen Nebenwirkungen auftraten.

2. Masitinib-Monotherapie beim caninen epitheliotropen Lymphom

Aufgrund der relativen Seltenheit der CETL gibt es nur wenige prospektive klinische Studien zu deren Therapie und oft werden, wie auch in dieser Studie, nur kleine Fallzahlen erreicht.

Im Gegensatz zu einer Studie von LONDON und Kollegen, in der der TKI SU11654 bei 6 Hunden mit CETL verwendet wurde und damit lediglich eine SD erreicht werden konnte (LONDON et al., 2003), erzielte Masitinib in unseren Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse. Die in dieser Studie erreichte

Ansprechrate von 70 % ist mit dem Erfolg anderer Medikamente vergleichbar. So erreichten Williams und Kollegen durch den Einsatz von Lomustin einen messbaren Tumorrückgang bei 78 % der Hunde (WILLIAMS et al., 2006). RISBON und Kollegen erreichten mit dem gleichen Wirkstoff sogar eine Ansprechrate von 83 % (RISBON et al., 2006). Allerdings handelt es sich in beiden Studien um retrospektive Auswertungen. Zusätzlich wurden einige Hunde gleichzeitig auch mit Cortisosteroiden behandelt, was das Ansprechen in einer Neoplasie wie dem CETL, die sehr häufig mit deutlichen Entzündungsprozessen einhergeht, positiv beeinflusst haben könnte. Die mediane Zeitspanne des Ansprechens von 85 Tagen ist mit den oben genannten Studien vergleichbar, bei denen die Tumoren nach 106 (WILLIAMS et al., 2006) bzw. 86 Tagen (RISBON et al., 2006) wieder an Größe zunahmen. Der Einsatz von PEGyliertem Doxorubicin bei 9 an CETL erkrankten Hunden zeigte eine Gesamtansprechrate von 44 % (VAIL et al., 1997), so dass Masitinib wohl dieser Therapie vorzuziehen wäre. Auch die Verwendung von PEGylierter L-Asparaginase führt nicht zu mit Masitinib oder Lomustin vergleichbaren Ergebnissen. MORIELLO et al. setzen es bei 9 Hunden mit CETL ein und erreichten lediglich partielle Remissionen, die in der Mehrzahl der Fälle auch nicht von langer Dauer waren (MORIELLO et al., 1993). Ein weiterer Nachteil der beiden oben genannten Zytostatika ist ihr großes Nebenwirkungspotenzial. So wurden bei 86 % der von WILLIAMS und Kollegen behandelten Hunde erhöhte Leberenzyme gemessen, außerdem kam es bei 29 und 22 % der Hunde zu einer Myelosuppression bzw. gastrointestinalen Symptomen. Ähnliches zeigte sich auch in der Studie von RISBON und Kollegen, die ebenfalls von einer Myelosuppression in 21 % ihrer Patienten berichten. Allerdings belief sich hier die Rate der Hunde mit Leberenzym erhöhungen lediglich auf 42 % (RISBON et al., 2006). Das PEGylierte liposomale Doxorubicin ist im Gegensatz zum ungebundenen Doxorubicin weniger cardiotoxisch und wirkt selektiver auf bestimmte Tumorzellen, doch bei ungefähr 25 % aller behandelten Hunde tritt das sogenannte Hand-Fuß-Syndrom, die palmar-plantare Erythrodysästhesie auf, die oft eine Dosisreduktion erfordert oder den weiteren Einsatz sogar unmöglich macht (VAIL et al., 1997).

Masitinib weist eine deutlich höhere Effektivität bei noch unbehandelten caninen Mastzelltumoren auf, das bewiesen die Untersuchungen von HAHN und Kollegen

von 2008 (HAHN et al., 2008). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der Studie dieser Arbeit bei der Behandlung von CETL gemacht werden. So waren alle 3 Hunde, die keinerlei Ansprechen auf den TKI zeigten, bereits vorbehandelt. Im Gegensatz dazu handelte es sich, mit Ausnahme eines Patienten, bei allen Hunden, deren Tumoren eine Größenreduktion zeigten, um chemotherapie-naive Tiere. Die Ursache dafür kann jedoch nicht evaluiert werden, da keine weiteren Biopsien aus den Tumoren nach der Therapie mit Masitinib entnommen wurden und so nur IHC-Ergebnisse von untherapierten Tumoren vorliegen. Man könnte vermuten, dass das schlechtere Ansprechen durch Änderungen der Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren sowie deren Bindungspartner hervorgerufen wurde. Allerdings können zytotoxische Substanzen in vielen Neoplasien zu Medikamentenresistenz oder aber zur Selektion resistenter Subklone der Tumorzellen führen. Die sogenannte *multi drug resistance* (MDR) kann sich in Tumorzellen nach Exposition zu einem bestimmten Medikament ausbilden und dann zu Kreuzresistenzen gegen andere Pharmaka führen, die sich in Struktur und Wirkmechanismus vollkommen von der anfänglich verabreichten Substanz unterscheiden (KRUH & BELINSKY, 2003; HAIMEUR A, 2004). Werden menschliche Leukämie-Zelllinien mit Zytostatika, wie zum Beispiel dem Anthracyclin Doxorubicin behandelt, kann es zur Ausbildung einer MDR durch die Überexpression des MDR 1-Gens kommen (MAHON et al., 2003). Dieses P-Glycoprotein oder ABCB1 (ATP-binding cassette transporter B1), eine Effluxpumpe auf der Zelloberfläche, reduziert die intrazelluläre Akkumulation und Verteilung cytotoxischer Medikamente (WOLKING et al., 2015). In der Studie von MAHON et al. zeigten die mit Doxorubicin vorbehandelte Zelllinien eine Kreuzresistenz zu Imatinib, die durch den P-Glycoprotein-Modulator Verapamil rückgängig gemacht werden konnte (MAHON et al., 2003). Allerdings konnte die niederländische Arbeitsgruppe um ZANDVLIET beweisen, dass Masitinib das P-Glycoprotein inhibieren und damit die Resistenz maligner Lymphome gegenüber Doxorubicin in caninen lymphoiden Zelllinien rückgängig machen kann (ZANDVLIET et al., 2013). THAMM und Kollegen wiesen eine durch Mastinib hervorgerufene Sensibilisierung vor allem von Blasenkarzinom- und Hämangiosarkom-Zelllinien gegenüber Doxorubicin nach, postulierten aber auch, dass die Kombination beider Medikamente effektiv bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen sein könnte, wobei in ihrer Studie nur eine vergleichbar geringe Sensibilisierung durch Masitinib gezeigt werden konnte (THAMM et al.,

2011). Letztlich fehlt es an *in-vivo*-Studien, die die Resistenzmechanismen von Masitinib besser beleuchten. Neben der erworbenen Resistenz gibt es nachweislich auch Neoplasien, die eine sogenannte „de novo“-Resistenz gegenüber TKI aufweisen, so dass eine Therapie, die aufgrund der biologischen und genetischen Voraussetzungen des Tumors eigentlich wirksam sein müsste, versagt (GARRAWAY & JÄNNE, 2012). In der hier beschriebenen Studie wurden keine Untersuchungen hinsichtlich möglicher Mutationen der Tumorkinasen vorgenommen. Von caninen Mastzelltumoren weiß man, dass die meisten c-Kit Mutationen an Exon 11 auftreten, doch auch Exon 7 und 8, sowie 17 sind häufiger betroffen (PRYER et al., 2003; LETARD et al., 2008). Durch diese Mutationen kommt es zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation, die in einzelnen Zelllinien auch zu einer verminderten Sensibilität gegenüber TKI führen kann (LETARD et al., 2008). In der Humanmedizin konnte bereits bewiesen werden, dass gastrointestinale stromale Tumoren (GIST) mit Kit-Mutationen an Exon 11 ein besseres Ansprechen auf eine TKI-Therapie zeigen als solche mit Mutationen an Exon 9 oder GIST ohne jegliche Kit- oder PDGFR-Mutation (HEINRICH et al., 2003). Alle bis auf eine Tumorbiopsie dieser Studie wiesen eine schwache bis starke Expression von PDGFR auf, wobei das Ansprechen unabhängig von der Stärke der Expression war. Möglicherweise beeinflussten jedoch die unterschiedlichen Mutationsmuster den Therapieerfolg.

Die immunhistochemische Darstellung von Kit und PDGFR, der beiden vorwiegend durch Masitinib inhibierten Tyrosinkinasen, und deren Liganden in den Tumorbiopsien der Hunde dieser Studie sollte klären, ob diese Rezeptoren und ihre Bindungspartner in den Proben vorhanden sind, um den Wirkmechanismus weiter zu erörtern. Allerdings konnte in keiner der untersuchten Biopsien eine Kit-Expression nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Kit, wenn überhaupt, nur eine sehr untergeordnete Rolle in der Pathogenese der CETL spielt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch GIANTIN et al. bei ihrer Untersuchung von caninen Lymphomen und Leukämien auf die Expression von Kit. In blastischen Lymphomen und undifferenzierten Leukämien kann häufiger die Expression des Rezeptors nachgewiesen werden (GIANTIN et al., 2013), wohingegen nur ein einzelner Fallbericht von der Exprimierung des Rezeptors bei einem Hund mit CETL berichtet (SHIOMITSU et al., 2012). Diese Beobachtungen werden von Studien aus der Humanmedizin

unterstützt. Hier wird Kit vorwiegend von hämatopoetischen Tumoren aus undifferenzierten Vorläuferzellen und nur selten von Neoplasien, die aus ausgereiften hämatopoetischen Zellen entstehen, exprimiert (GIANTIN et al., 2013). Kutane Lymphome des Menschen weisen nur in 30 bis 50 % aller Fälle eine Kit-Expression auf (BRAUNS et al., 2004). Eine weitere humanmedizinische Studie, bei der 168 CD30⁺ Lymphome, darunter auch 15 anaplastische großzellige Lymphome untersucht wurden, wies nur selten die Expression des Kit-Rezeptors nach (RASSIDAKIS GZ, 2004).

Da Masitinib neben Kit und PDGFR auch die Aktivität anderer RTK, nämlich die *Lymphocyte-specific kinase* (Lck), das *Lck/Yes-related protein* (LYn), den FGFR3 und die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) hemmen kann (MARECH et al.), könnte vermutet werden, dass diese für die Wirkung des TKI in CETL verantwortlich sind. Interessanterweise wurde, mit Ausnahme von einem, in allen Hunden, die auf die Therapie ansprachen, eine SCF-Expression nachgewiesen. Bei den beiden Hunden mit PD, deren Biopsien untersucht werden konnten, verlief der Nachweis des Rezeptors negativ. Einer dieser beiden Hunde hatte vor Entnahme der Biopsie einmalig eine Kortisoninjektion erhalten, so dass dies möglicherweise die Expression des Wachstumsfaktors und somit auch das Ansprechen auf die Therapie beeinträchtigt haben könnte. SCF ist nicht nur Bindungspartner von Kit, sondern weist auch synergistische Effekte auf andere Wachstumsfaktorrezeptoren, wie den Erythropoetin- und den IL-3-Rezeptor auf und kann damit deren Phosphorylierung beeinflussen (LIU et al., 1994; WU et al., 1995; JACOBS-HELBERT et al., 1997; SUI et al., 1998). In der Humanmedizin konnte bereits gezeigt werden, dass Lck zusammen mit anderen Rezeptoren die Apoptose von Lymphomzellen beeinflusst (PATERSON et al., 2006). Um beurteilen zu können, ob der SCF und Lck beziehungsweise auch andere Signalwege, die weder Kit- noch PDGFR-abhängig sind, einen Einfluss auf die Genese von CETL und damit auch auf die Wirkweise von Masitinib haben, sind weitere Studien nötig. Entzündliche Prozesse können zu einer Hochregulation der PDGFR- β -Expression führen, während der Rezeptor unter physiologischen Umständen nur in sehr geringem Maß exprimiert wird (RUBIN et al., 1988). Da CETL in der Regel mit deutlichen entzündlichen Prozessen einhergehen, wäre zu erwarten gewesen, dass die Immunhistologie diesen Rezeptor in vielen Tumoren nachweisen werde. Widererwartend konnte jedoch nur in einer Probe eine stark positive Reaktion

gesehen werden, ansonsten fiel die Untersuchung schwach positiv oder, in der Mehrzahl der Biopsien, negativ aus. Aus den Untersuchungen der in dieser Arbeit aufgeführten Studie kann der Schluss gezogen werden, dass PDGFR- β und sein Ligand, wenn überhaupt, nur einen geringfügigen Einfluss auf die Pathogenese von CETL hat. Dies wird durch die Tatsache bestärkt, dass der Hund, bei dem mittels Masitinib eine CR erreicht werden konnte, weder PDGFR- β , noch PDGF-BB exprimierte. Da 5 der untersuchten Tumoren einen stark positiven, 2 weitere einen schwach positiven Nachweis von PDGFR- α lieferten, könnte dies einen potenziellen Angriffspunkt für Masitinib darstellen. Allerdings zeigte auch 2 Tumoren mit PD eine starke Expression des Rezeptors, was diese Theorie wieder in Frage stellt. Da in dieser Studie jedoch nur 2 von 3 bekannten PDGFR und nur 2 von 5 ihrer Liganden immunhistochemisch untersucht wurden, kann nur eine eingeschränkte Aussage über den Einfluss dieser Wachstumsfaktoren getroffen werden. Gerade PDGF-AB kann einen stärkeren mitotischen und chemotaktischen Effekt hervorrufen als PDGF-AA und -BB. Eine Voraussetzung für diesen Effekt ist jedoch das Vorliegen von PDGFR- α und - β in gleicher Menge (HEIDARAN et al., 1991; RUPP et al., 1994). In der Immunhistochemie konnte jedoch nur in einer Probe eine starke Expression beider Rezeptoren gesehen werden.

Nicht nur eine Tumorregression, sondern auch eine Palliation klinischer Symptome ist von großer Bedeutung in der antineoplastischen Therapie. Vor allem Letzteres nimmt in der Veterinärmedizin oft noch einen höheren Stellenwert ein. Dies zeigte sich auch an einem der Studienhunde. Er entwickelte nach 2 Monaten mit Masitinib PD. Da seine Hautveränderungen zwar an Größe zunahmen, sich jedoch weiterhin trocken und reizlos und nicht mehr exsudativ und juckend präsentierten, beschlossen die Besitzer ihn weiterhin mit dem TKI zu therapieren. In der Analyse von FONTAINE et al. zeigte sich, dass 40 % der Hunde mit CETL an Pruritus leiden, noch mehr Tiere werden mit Erosionen (60 %) und krustigen Veränderungen (46,6 %) vorgestellt (FONTAINE et al., 2010). Die mit den Hautveränderungen assoziierten Symptome stellen eine große Belastung und Einschränkung der Lebensqualität der Hunde dar und führen in nicht wenigen Fällen dazu, dass die Tiere euthanasiert werden. Daher könnte sich Masitinib möglicherweise auch zur Palliativtherapie eignen. Diese These wird durch die Ergebnisse der Studie von CADOT et al. unterstützt. Hier wurde der TKI bei caniner atopischer Dermatitis eingesetzt und führte zu einer signifikanten

Besserung der Symptome im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielt (CADOT et al., 2011). Zusätzlich konnte, wie bereits in früheren Abschnitten dieser Arbeit erwähnt, nachgewiesen werden, dass mehrere Neoplasien, wie die Mastitis karzinomatosa oder canine Plattenepithelkarzinome des Planum nasale, die oft mit deutlichen entzündlichen Veränderungen einhergehen, ein Ansprechen auf den TKI Toceranib zeigen (LONDON et al., 2012). Bisher wurde postuliert, dass diese Effekte auf der antiangiogenetischen Wirkung durch die Blockade des VEGFR beruhen, doch der tatsächliche Wirkmechanismus von TKI in Kit-unabhängigen Tumoren konnte bisher nicht dargestellt werden. Anhand der oben genannten Aspekte könnte vermutet werden, dass TKI generell und unabhängig von VEGFR einen positiven Einfluss auf entzündliche Neoplasien haben könnten. Zur Bestätigung dieser These sind jedoch weitere Studien nötig.

Es traten nur wenige und vorwiegend milde Nebenwirkungen bei den hier behandelten Hunden im Zuge der Masitinibtherapie auf. Dies war aufgrund der Ergebnisse von HAHN und Kollegen zu erwarten (HAHN et al., 2008). Allerdings wurde einer der Hunde aufgrund von schwerwiegender Diarrhoe als Nebenwirkung der Medikation euthanasiert. Es könnte daher zu befürchten sein, dass eine Kombination des TKI mit Chemotherapeutika zu schlimmeren Nebenwirkungen führen könnte. Die Ergebnisse von MITCHELL et al. zum Einsatz von Cyclophosphamid zusammen mit Toceranib widerlegen diese Befürchtungen nur teilweise, da sie in ihrer Studie Cyclophosphamid nur in der für eine metronomische Therapie üblichen niedrigen Dosierung verabreichten. Dabei traten ausschließlich milde bis moderate Nebenwirkungen auf (MITCHELL et al., 2012). Ähnliche Beobachtungen machten auch LONDON et al., die Toceranib mit dem nicht-steroidalen Antiphlogistikum Piroxicam und niedrig dosiertem Cyclophosphamid bei Hunden mit Osteosarkomen, die bereits Carboplatin erhalten hatten, einsetzten. Hier traten zwar in der Toceranib-Gruppe signifikant häufiger Nebenwirkungen auf als in der Kontrollgruppe, doch diese waren in der Regel mild (LONDON et al., 2015). Zu Masitinib gibt es bisher keine Studien, die die Kombination mit anderen Medikamenten in vivo untersuchten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl feline Injektionsstellen-assoziierte Sarkome (*feline injection site sarcoma* (FISS)) als auch canine epitheliotrope T-Zelllymphome (CETL) stellen in der Veterinärmedizin eine therapeutische Herausforderung dar. Die *molecular target therapy* hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung zugenommen. Und Toceranib und Mastinib sind die ersten Wirkstoffe, die explizit für die Behandlung von Krebserkrankungen bei Tieren zugelassen wurden.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Studien zum Einsatz von Toceranib bei nicht resezierbaren FISS und von Mastinib bei CETL erbrachten eher enttäuschende Ergebnisse hinsichtlich der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)-Therapie des FISS, doch Masitinib scheint ein vielversprechendes Potential für die Behandlung von CETL zu haben.

Aufgrund der mit dieser Studie gezeigten relativ guten Verträglichkeit von Toceranib bei Katzen eignet sich das Medikament möglicherweise dazu in anderen feline Neoplasien oder bei Katzen mit FISS mit nur noch residualer post-operativer Tumorbürde eingesetzt und auf seine Effektivität hin untersucht zu werden. Die Erwartungen an einen therapeutischen Effekt bei makroskopischen Tumoren des FISS wurden leider nicht erfüllt.

Da auch bei den Hunden durch die Behandlung mit Masitinib nur wenige Nebenwirkungen auftraten und sowohl komplette als auch partielle Remissionen erreicht werden konnten, erweist sich Masitinib als effektives Therapeutikum bei CETL und könnte sich zudem zur Integration in einen multimodalen Therapieansatz bei CETL eignen.

Mittels immunhistochemischer Untersuchung der Tumorbiopsie konnte gezeigt werden, dass Kit weder in FISS noch in CETL eine entscheidende Rolle der in Tumorgenese der Neoplasien spielt, da der Rezeptor in keiner einzigen Probe nachgewiesen werden konnte. Auch der Einfluss der anderen untersuchten Rezeptortyrosinasen (RTK), wie dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und dem *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) muss, anhand der vorliegenden Daten als eher zweifelhaft eingestuft werden. Da kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die Therapie und der Expression der Rezeptoren gesehen werden konnte.

Allerdings dürfen hier, aufgrund der Limitationen beider Studien keine voreiligen Schlüsse gezogen werden. So wurde in beide Untersuchungen nur eine relativ geringe Zahl an Tieren mit heterogener Präsentation ihrer Neoplasien eingeschlossen. Die Effektivität des Masitinib in der Therapie des CETL müsste in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie überprüft werden.

VI. SUMMARY

Feline injection site sarcoma (FISS) and canine epitheliotropic T-cell lymphoma (CETL) are still a therapeutic challenge in veterinary medicine. Molecular target therapy has distinctly gained in importance in oncological practice over the last few years. Masitinib and Toceranib are the first active agents approved of treatment of veterinary cancer patients.

The two clinical trials presented in this work, investigating efficacy and side effects of toceranib in FISS and masitinib in CETL showed disappointing results in FISS, but tends to have promising potential for treatment of CETL.

Since toceranib has been well tolerated by those cats treated in this study, it could possibly be used in other feline neoplasia or in cats with FISS with only microscopic tumor residues. Further clinical trials are necessary to support this thesis. Expectations regarding its therapeutic effects in macroscopic disease of FISS were belied.

There were only few and mainly mild side effects seen in the dogs treated with masitinib. But since complete remission (CR) was achieved in a few cases and most dogs showed partial remission (PR), masitinib may be qualified to treat CETL and for integration into a multimodal therapy concept for CETL.

Immunohistochemistry of biopsies from both, FISS and CETL proved that Kit does not seem to have any impact on tumorigenesis in these neoplasia, since none of the tumor specimens showed expression of this receptor. The influence of the other receptor tyrosine kinases (RTK) evaluated, vascular endothelial growth receptor VEGFR and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) seems also doubtful. Since there was no correlation between response to therapy and the expression of these receptors detected.

However, these results need to be interpreted with caution due to the limitations of the studies, given the fact that only heterogeneous, small groups of patients were treated. Therefore, further investigations are needed to substantiate the findings and elucidate the pathways by which toceranib and masitinib act against FISS and CETL, respectively. And efficacy of masitinib in treating CETL should be proven bei placebo-controlled double-blinded studies.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abadie, J., Hedan, B., Cadieu, E., De Brito, C., Devauchelle, P., Bourgain, C., Parker, H. G., Vaysse, A., Margaritte-Jeannin, P., Galibert, F., Ostrander, E. A. and Andre, C. Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *J Hered* 2009, 100 Suppl 1: S19-27.

Adachi, M., Hoshino, Y., Izumi, Y. and Takagi, S. Immunohistochemical detection of a potential molecular therapeutic target for canine hemangiosarcoma. *J Vet Med Sci* 2015, advpub:

Advani, A. S. C-kit as a target in the treatment of acute myelogenous leukemia. *Curr Hematol Rep* 2005, 4: 51-8.

Ahmed, N. and Heslop, H. E. Viral lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol* 2006, 13: 254-9.

Ahn, C. S., ALSayyah, A. and Sangüeza, O. P. Mycosis Fungoides: An Updated Review of Clinicopathologic Variants. *Am J Dermatopathol*. 2014, 36: 933-951.

Al-Dissi, A. N., Haines, D. M., Singh, B. and Kidney, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Vet Pathol* 2007, 44: 823-30.

Al-Dissi, A. N., Haines, D. M., Singh, B. and Kidney, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas. *J Comp Pathol* 2009, 141: 229-36.

Alitalo, K. and Carmeliet, P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002, 1: 219-27.

Anan, K., Morisaki, T., Katano, M., Ikubo, A., Kitsuki, H., Uchiyama, A., Kuroki, S., Tanaka, M. and Torisu, M. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 1996, 119: 333-9.

Andersson, J., Bumming, P., Meis-Kindblom, J. M., Sihto, H., Nupponen, N., Joensuu, H., Oden, A., Gustavsson, B., Kindblom, L. G. and Nilsson, B. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 2006, 130: 1573-81.

Antoniades, H. N., Scher, C. D. and Stiles, C. D. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76: 1809-13.

Apisarnthanarax, N., Talpur, R. and Duvic, M. Treatment of cutaneous T cell lymphoma: current status and future directions. *Am J Clin Dermatol* 2002, 3: 193-215.

Banerji, N. and Kanjilal, S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res* 2006, 67: 1766-72.

Banerji, N., Kapur, V. and Kanjilal, S. Association of germ-line polymorphisms in the feline p53 gene with genetic predisposition to vaccine-associated feline sarcoma. *J Hered* 2007, 98: 421-7.

Banerji, N., Li, X., Klausner, J. S., Kapur, V. and Kanjilal, S. Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel. *Am J Vet Res* 2002, 63: 728-32.

Barabas, K., Milner, R., Lurie, D. and Adin, C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol* 2008, 6: 1-18.

Barber, L. G., Sorenmo, K. U., Cronin, K. L. and Shofer, F. S. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline

fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000, 36: 416-21.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A. and Marme, D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996, 87: 3336-43.

Basilico, C. and Moscatelli, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992, 59: 115-65.

Beckmann, M. P., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Westermark, B., Di Marco, E., Di Fiore, P. P., Robbins, K. C. and Aaronson, S. A. Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science* 1988, 241: 1346-9.

Belehradek, M., Domenge, C., Luboinski, B., Orlowski, S., Behlradek, J., Jr. and Mir, L. M. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 1993, 72: 3694-700.

Bellamy, F., Bader, T., Moussy, A. and Hermine, O. Pharmacokinetics of masitinib in cats. *Vet Res Commun* 2009, 33: 831-7.

Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C. H., Alitalo, K. and Eriksson, U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001, 3: 512-6.

Berk, B. C., Alexander, R. W., Brock, T. A., Gimbrone, M. A., Jr. and Webb, R. C. Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science* 1986, 232: 87-90.

Bernabe, L., Portela, R., Nguyen, S., Kisseberth, W., Pennell, M., Yancey, M. and London, C. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Vet Res* 2013, 9: 190.

Berti, E., Cerri, A., Cavicchini, S., Delia, D., Soligo, D., Alessi, E. and Caputo, R. Primary cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma presenting as disseminated pagetoid reticulosis. *J Invest Dermatol* 1991, 96: 718-23.

Besmer, P. The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Curr Opin Cell Biol* 1991, 3: 939-46.

Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F. H., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder, H. W., Jr., Brodeur, D., Zuckerman, E. E. and Hardy, W. D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986, 320: 415-21.

Betsholtz, C., Westermark, B., Ek, B. and Heldin, C. H. Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. *Cell* 1984, 39: 447-57.

Bhang, D. H., Choi, U. S., Kim, M. K., Choi, E. H., Kang, M. S., Hwang, C. Y., Kim, D. Y., Youn, H. Y. and Lee, C. W. Epitheliotropic cutaneous lymphoma (mycosis fungoides) in a dog. *J Vet Sci* 2006, 7: 97-9.

Bhardwaj, B., Klassen, J., Cossette, N., Sterns, E., Tuck, A., Deeley, R., Sengupta, S. and Elliott, B. Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996, 2: 773-82.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. and Rifkin, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997, 18: 26-45.

Blom, T., Roselli, A., Hayry, V., Tynnenen, O., Wartiovaara, K., Korja, M., Nordfors, K., Haapasalo, H. and Nupponen, N. N. Amplification and overexpression of KIT, PDGFRA, and VEGFR2 in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors. *J Neurooncol* 2010, 97: 217-24.

Bostrom, H., Willetts, K., Pekny, M., Leveen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H., Pekna, M., Hellstrom, M., Gebre-Medhin, S., Schalling, M., Nilsson, M., Kurland, S., Tornell, J., Heath, J. K. and Betsholtz, C. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 1996, 85: 863-73.

Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A. and Jove, R. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 7319-24.

Brachelente, Affolter, Fondati, Porcellato, Sforna, Lepri, Mechelli and Bongiovanni. CD3 and CD20 Coexpression in a Case of Canine Cutaneous Epitheliotropic T-Cell Lymphoma (Mycosis Fungoides). *Vet Pathol* 2015:

Brauns, T. C., Schultewolter, T., Dissemond, J., Maschke, J. and Goos, M. C-KIT expression in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Journal of Cutaneous Pathology* 2004, 31: 577-582.

Bray, J. and Polton, G. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy combined with anatomical resection of feline injection-site sarcoma: results in 21 cats. *Vet Comp Oncol* 2014: n/a-n/a.

Bregazzi, V. S., LaRue, S. M., McNiel, E., Macy, D. W., Dernell, W. S., Powers, B. E. and Withrow, S. J. Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001, 218: 547-50.

Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997, 90: 1345-64.

Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J. and Lydon, N. B. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996, 56: 100-4.

Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Regenass, U. and Lydon, N. B. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92: 2558-62.

Buracco, P., Martano, M., Morello, E. and Ratto, A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 2002, 163: 105-7.

Burg, G., Dummer, R., Haeffner, A., Kempf, W. and Kadin, M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol* 2001, 137: 949-52.

Burnett, R. C., Vernau, W., Modiano, J. F., Olver, C. S., Moore, P. F. and Avery, A. C. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 2003, 40: 32-41.

Burton, G. and Mason, K. V. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet J* 1997, 75: 102-6.

Caciolo, P. L., Nesbitt, G. H., Patnaik, A. K. and Hayes, A. A. Cutaneous lymphosarcoma in the cat: a report of nine cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984, 20: 491-496.

Cadot, P., Hensel, P., Bensignor, E., Hadjaje, C., Marignac, G., Beco, L., Fontaine, J., Jamet, J. F., Georgescu, G., Campbell, K., Cannon, A., Osborn, S. C., Messinger, L., Gogny-Goubert, M., Dubreuil, P., Moussy, A. and Hermine, O. Masitinib decreases signs of canine atopic dermatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Vet Dermatol* 2011, 22: 554-64.

Calzolari, F. and Malatesta, P. Recent Insights into PDGF-Induced Gliomagenesis. *Brain Pathol* 2010, 20: 527-538.

Campbell, K. L. (2004) *Small Animal Dermatology Secrets*, edn. Hanley and Belfus, Urbana, IL.

Carlsten, K. S., London, C. A., Haney, S., Burnett, R., Avery, A. C. and Thamm, D. H. Multicenter prospective trial of hypofractionated radiation treatment, toceranib, and prednisone for measurable canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2012, 26: 135-41.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T., DiPalma, T., Dewerchin, M., Noel, A., Stalmans, I., Barra, A., Blacher, S., Vandendriessche, T., Ponten, A., Eriksson, U., Plate, K. H., Foidart, J. M., Schaper, W., Charnock-Jones, D. S., Hicklin, D. J., Herbert, J. M., Collen, D. and Persico, M. G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001, 7: 575-83.

Carminato, A., Vascellari, M., Marchioro, W., Melchioti, E. and Mutinelli, F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol* 2011, 22: 565-9.

Carvalho, M. I., Pires, I., Dias, M., Prada, J., Gregório, H., Lobo, L. and Queiroga, F. Intratumoral CD3+ T-Lymphocytes Immunoexpression and Its Association with c-Kit, Angiogenesis, and Overall Survival in Malignant Canine Mammary Tumors. *Anal Cellular Pathol (Amst)* 2015, 2015: 920409.

Cerruti, F., Martano, M., Morello, E., Buracco, P. and Cascio, P. Proteasomes are not a target for doxorubicin in feline injection-site sarcoma. *J Comp Pathol* 2010, 143: 164-72.

Chang, H. W., Ho, S. Y., Lo, H. F., Tu, Y. C., Jeng, C. R., Liu, C. H., Wang, F. I. and Pang, V. F. Vaccine-associated rhabdomyosarcoma with spinal epidural invasion and pulmonary metastasis in a cat. *Vet Pathol* 2006, 43: 55-8.

Chao, C., Al-Saleem, T., Brooks, J. J., Rogatko, A., Kraybill, W. G. and

Eisenberg, B. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann Surg Oncol* 2001, 8: 260-7.

Cho, S., Kitadai, Y., Yoshida, S., Tanaka, S., Yoshihara, M., Yoshida, K. and Chayama, K. Deletion of the KIT gene is associated with liver metastasis and poor prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumor in the stomach. *Int J Oncol* 2006, 28: 1361-7.

Chon, E., McCartan, L., Kubicek, L. N. and Vail, D. M. Safety evaluation of combination toceranib phosphate (Palladia(R)) and piroxicam in tumour-bearing dogs (excluding mast cell tumours): a phase I dose-finding study(*). *Vet Comp Oncol* 2011:

Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J. and Risau, W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996, 271: 17629-34.

Cohen, M., Wright, J. C., Brawner, W. R., Smith, A. N., Henderson, R. and Behrend, E. N. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001, 219: 1582-9.

Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Cho, B. C., Donovan, P. J., Jenkins, N. A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S. D. and Williams, D. E. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 1990, 63: 175-83.

Corless, C. L., McGreevey, L., Town, A., Schroeder, A., Bainbridge, T., Harrell, P., Fletcher, J. A. and Heinrich, M. C. KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004, 6: 366-70.

Couto, C. G. and Macy, D. W. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998, 213: 1426-7.

Couto, S. S., Griffey, S. M., Duarte, P. C. and Madewell, B. R. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 2002, 39: 33-41.

Coyne, M. J., Reeves, N. C. and Rosen, D. K. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 1997, 210: 249-51.

Cronin, K., Page, R. L., Spodnick, G., Dodge, R., Hardie, E. N., Price, G. S., Ruslander, D. and Thrall, D. E. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998, 39: 51-6.

Cunningham, L. D., Brecher, P. and Cohen, R. A. Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta. *J Clin Invest* 1992, 89: 878-82.

Czock, D., Keller, F., Rasche, F. M. and Haussler, U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005, 44: 61-98.

Daly, M., Sheppard, S., Cohen, N., Nabity, M., Moussy, A., Hermine, O. and Wilson, H. Safety of masitinib mesylate in healthy cats. *J Vet Intern Med* 2011, 25: 297-302.

Daly, M. K., Saba, C. F., Crochik, S. S., Howerth, E. W., Kosarek, C. E., Cornell, K. K., Roberts, R. E. and Northrup, N. C. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008, 10: 202-5.

Daniel, T. O., Gibbs, V. C., Milfay, D. F., Garovoy, M. R. and Williams, L. T. Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1986, 261: 9579-82.

Dave, H., Trivedi, S., Shah, M. and Shukla, S. Transforming growth factor beta 2: a predictive marker for breast cancer. *Indian J Exp Biol* 2011, 49: 879-87.

Davidson, E. B., Gregory, C. R. and Kass, P. H. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997, 26: 265-9.

Davis, K. M., Hardie, E. M., Lascelles, B. D. and Hansen, B. Feline fibrosarcoma: perioperative management. *Compend Contin Educ Vet* 2007, 29: 712-4, 716-20, 722-9 *passim*.

Day, M. J., Schoon, H. A., Magnol, J. P., Saik, J., Devauchelle, P., Truyen, U., Gruffydd-Jones, T. J., Cozette, V., Jas, D., Poulet, H., Pollmeier, M. and Thibault, J. C. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 2007, 25: 4073-84.

de Lorimier, L. P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006, 36: 213-28, viii-ix.

De Man, M. M. and Ducatelle, R. V. Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg* 2007, 9: 432-4.

de Mello Souza, C. H., Valli, V. E., Selting, K. A., Kiupel, M. and Kitchell, B. E. Immunohistochemical detection of retinoid receptors in tumors from 30 dogs diagnosed with cutaneous lymphoma. *J Vet Intern Med* 2010, 24: 1112-7.

de Vos, J., Ramos Vega, S., Noorman, E. and de Vos, P. Primary frontal sinus squamous cell carcinoma in three dogs treated with piroxicam combined with carboplatin or toceranib. *Vet Comp Oncol* 2011:

Dean, R. S., Pfeiffer, D. U. and Adams, V. J. The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Vet Res* 2013, 9: 17-17.

Demetriou, J. L., Brearley, M. J., Constantino-Casas, F., Addington, C. and Dobson, J. Intentional marginal excision of canine limb soft tissue sarcomas

followed by radiotherapy. *J Small Anim Pract* 2012, 53: 174-181.

Devulder, J., Lambert, J. and Naeyaert, J. M. Gabapentin for pain control in cancer patients' wound dressing care. *J Pain Symptom Manage* 2001, 22: 622-6.

Dikov, M. M., Ohm, J. E., Ray, N., Tchekneva, E. E., Burlison, J., Moghanaki, D., Nadaf, S. and Carbone, D. P. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2005, 174: 215-22.

Dillon, C. J., Mauldin, G. N. and Baer, K. E. Outcome following surgical removal of nonvisceral soft tissue sarcomas in cats: 42 cases (1992-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2005, 227: 1955-7.

Doddy, F. D., Glickman, L. T., Glickman, N. W. and Janovitz, E. B. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol* 1996, 114: 165-74.

Dolberg, D. S., Hollingsworth, R., Hertle, M. and Bissell, M. J. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science* 1985, 230: 676-8.

Donaldson, D. and Day, M. J. Epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) presenting as blepharoconjunctivitis in an Irish setter. *J Small Anim Pract* 2000, 41: 317-20.

Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A. and Antoniades, H. N. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 1983, 221: 275-7.

Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. E. and London, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002, 63: 1718-23.

Dreitz, M. J., Ogilvie, G. and Sim, G. K. Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as markers of malignant T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999, 69: 113-9.

Druker, B. J. and Lydon, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 2000, 105: 3-7.

Dubielzig, R. R. Ocular sarcoma following trauma in three cats. *J Am Vet Med Assoc* 1984, 184: 578-81.

Dubielzig, R. R., Everitt, J., Shadduck, J. A. and Albert, D. M. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol* 1990, 27: 62-5.

Dubielzig, R. R., Hawkins, K. L. and Miller, P. E. Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J Vet Diagn Invest* 1993, 5: 637-8.

DuBois, S. and Demetri, G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer* 2007, 109: 813-9.

Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Casteran, N., Borge, L., Hajem, B., Lermet, A., Sippl, W., Voisset, E., Arock, M., Auclair, C., Leventhal, P. S., Mansfield, C. D., Moussy, A. and Hermine, O. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One* 2009, 4: e7258.

Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M. and Alitalo, K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998, 282: 946-9.

Dyer, F., Spagnuolo-Weaver, M., Cooles, S. and Tait, A. Suspected adverse

reactions, 2006. Vet Rec 2007, 160: 748-50.

Eckstein, C., Guscetti, F., Roos, M., Martin de las Mulas, J., Kaser-Hotz, B. and Rohrer Bley, C. A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. Vet Comp Oncol 2009, 7: 54-68.

Edelberg, J. M., Aird, W. C., Wu, W., Rayburn, H., Mamuya, W. S., Mercola, M. and Rosenberg, R. D. PDGF mediates cardiac microvascular communication. J Clin Invest 1998, 102: 837-43.

Edwards, D. S., Henley, W. E., Harding, E. F., Dobson, J. M. and Wood, J. L. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. Vet Comp Oncol 2003, 1: 200-6.

Ellis, J. A., Jackson, M. L., Bartsch, R. C., McGill, L. G., Martin, K. M., Trask, B. R. and Haines, D. M. Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. J Am Vet Med Assoc 1996, 209: 767-71.

Embil, J. M. and Nagai, M. K. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. Expert Opin Biol Ther 2002, 2: 211-218.

Ernst, S. I., Hubbs, A. E., Przygodzki, R. M., Emory, T. S., Sobin, L. H. and O'Leary, T. J. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. Lab Invest 1998, 78: 1633-6.

Eskens, F. A. L. M. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? Br J Cancer 2004, 90: 1-7.

Esplin, D. G., Bigelow, M. and McGill, L. D. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron

injection in a cat. Vet Cancer Soc Newsletter 1999, 23: 8 - 9

Esplin, D. G. and Campbell, R. Widespread metastasis of a fibrosarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Pract* 1995, 33: 13 - 6.

Esplin, D. G., Jaffe, M. H. and McGill, L. D. Metastasizing liposarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Pract* 1996, 24: 91 - 5.

Esplin, D. G., McGill, L. D., Meininger, A. C. and Wilson, S. R. Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993, 202: 1245-7.

Fan, T. M., Kitchell, B. E., Dhaliwal, R. S., Jones, P. D., Hintermeister, J. G. and Paria, B. C. Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: critical assessment of a practical dosing regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002, 38: 357-63.

Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 280: C1358-C1366.

Fleming, T. P., Matsui, T., Molloy, C. J., Robbins, K. C. and Aaronson, S. A. Autocrine mechanism for v-sis transformation requires cell surface localization of internally activated growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 8063-7.

Fleming, T. P., Saxena, A., Clark, W. C., Robertson, J. T., Oldfield, E. H., Aaronson, S. A. and Ali, I. U. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 1992, 52: 4550-3.

Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992, 3: 65-71.

Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. and Hanahan, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989, 339: 58-61.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995, 376: 66-70.

Fontaine, J., Bovens, C., Bettenay, S. and Mueller, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol* 2009, 7: 1-14.

Fontaine, J., Heimann, M. and Day, M. J. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol* 2010, 21: 267-75.

Force, V.-A. F. S. T. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force guidelines. Diagnosis and treatment of suspected sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 214: 1745.

Force, V.-A. F. S. T. The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2005, 226: 1821-42.

Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C. H., Herlyn, M. and Westermark, B. Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 393-7.

Foss, B., Ulvestad, E. and Bruserud, O. Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol* 2001, 67: 267-78.

Foster, A. P., Evans, E., Kerlin, R. L. and Vail, D. M. Cutaneous T-cell lymphoma with Sezary syndrome in a dog. *Vet Clin Pathol* 1997, 26: 188-192.

Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Chabanne, L., Ghernati, I., Marchal, T., Bonnefond, C., Bryon, P. A. and Felman, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67

antigen. J Comp Pathol 1997, 117: 61-72.

Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J. L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I. and Magnol, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. Vet Pathol 2002, 39: 92-109.

Fulton, L. M., Bromberg, N. M. and Goldschmidt, M. H. Soft Tissue Fibrosarcoma with Intraocular Metastasis in a Cat. Prog Vet Comp Ophthalmol 1991, 1: 129 - 32.

Furuhashi, M., Sjoblom, T., Abramsson, A., Ellingsen, J., Micke, P., Li, H., Bergsten-Folestad, E., Eriksson, U., Heuchel, R., Betsholtz, C., Heldin, C. H. and Ostman, A. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. Cancer Res 2004, 64: 2725-33.

Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., Statkov, P. R. and Majno, G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. J Exp Med 1972, 135: 719-34.

Gagnon, A. C. Drug injection associated fibrosarcoma in a cat. Feline Pract 2000, 28: 18 - 21.

Galli, S. J., Zsebo, K. M. and Geissler, E. N. The kit ligand, stem cell factor. Adv Immunol 1994, 55: 1-96.

Galy, B., Maret, A., Prats, A. C. and Prats, H. Cell transformation results in the loss of the density-dependent translational regulation of the expression of fibroblast growth factor 2 isoforms. Cancer Res 1999, 59: 165-71.

Garcia, R., Yu, C. L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K. L., Smithgall, T., Fujita, D. J., Ethier, S. P. and Jove, R. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts

transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997, 8: 1267-76.

Garraway, L. A. and Jänne, P. A. Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine. *Cancer Discov* 2012, 2: 214-226.

Gerdes, J., Dallenbach, F., Lennert, K., Lemke, H. and Stein, H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 1984, 2: 365-71.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D. and Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003, 161: 1163-77.

Gerharz, C. D., Ramp, U., Reinecke, P., Schardt, C., Friebe, U., Dejosez, M., Nitsch, T. and Gabbert, H. E. Analysis of growth factor-dependent signalling in human epithelioid sarcoma cell lines. clues To the role of autocrine, juxtacrine and paracrine interactions in epithelioid sarcoma. *Eur J Cancer* 2000, 36: 1171-9.

Ghernati, I., Corbin, A., Chabanne, L., Auger, C., Magnol, J. P., Fournel, C., Monier, J. C., Darlix, J. L. and Rigal, D. Canine large granular lymphocyte leukemia and its derived cell line produce infectious retroviral particles. *Vet Pathol* 2000, 37: 310-7.

Ghosh, S. K., Abrams, J. T., Terunuma, H., Vonderheid, E. C. and DeFreitas, E. Human T-cell leukemia virus type I tax/rex DNA and RNA in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1994, 84: 2663-71.

Giantin, M., Aresu, L., Aricò, A., Gelain, M. E., Riondato, F., Comazzi, S. and Dacasto, M. Evaluation of tyrosine-kinase receptor c-kit mutations, mRNA and protein expression in canine lymphoma: Might c-kit represent a therapeutic target? *Veterinary Immunol Immunopathol* 2013, 154: 153-159.

Gilfillan, A. M. and Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006, 6: 218-30.

Giudice, C., Stefanello, D., Sala, M., Cantatore, M., Russo, F., Romussi, S., Travetti, O., Di Giancamillo, M. and Grieco, V. Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J* 2010, 186: 84-8.

Goad, M., Lopez, M. and D., G. Expression of tumor suppressor genes and oncogenes

in feline injection-site associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 1999, 13: 285.

Gobar, G. M. and Kass, P. H. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002, 220: 1477-82.

Gospodarowicz, D. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *Int J Rad Appl Instrum B* 1987, 14: 421-34.

Gotlib, J. KIT mutations in mastocytosis and their potential as therapeutic targets. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006, 26: 575-92.

Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. and Affolter, V. K. (2005) *Skin Disease of the Dog and the Cat, Clinical and Histopathological Diagnosis*, edn. Blackwell Science, Oxford.

Haddad, J. L., Goldschmidt, M. H. and Patel, R. T. Fibrosarcoma arising at the site of a retained surgical sponge in a cat. *Vet Clin Pathol* 2010, 39: 241-6.

Haghighi, B., Smoller, B. R., LeBoit, P. E., Warnke, R. A., Sander, C. A. and Kohler, S. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2000, 13: 502-10.

Hahn, K. A., Endicott, M. M., King, G. K. and Harris-King, F. D. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007, 231: 742-5.

Hahn, K. A., Legendre, A. M., Shaw, N. G., Phillips, B., Ogilvie, G. K., Prescott, D. M., Atwater, S. W., Carreras, J. K., Lana, S. E., Ladue, T., Rusk, A., Kinet, J. P., Dubreuil, P., Moussy, A. and Hermine, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am J Vet Res* 2010, 71: 1354-61.

Hahn, K. A., Ogilvie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P. S., Kinet, J. P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A. and Hermine, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008, 22: 1301-9.

Haimeur A, C. G., Deeley RG, Cole SP. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004, 5: 21-53.

Hampel, V., Schwarz, B., Kempf, C., Kostlin, R., Schillinger, U., Kuchenhoff, H., Fenske, N., Brill, T. and Hirschberger, J. Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega. *J Vet Intern Med* 2007, 21: 1340-6.

Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86: 353-64.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144: 646-74.

Harris, C., Pierce, K., King, G., Yates, K. M., Hall, J. and Tizard, I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother* 1991, 3: 207-13.

Harris, C. C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88: 1442-55.

Hartmann, K., Day, M. J., Thiry, E., Lloret, A., Frymus, T., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Truyen, U., Möstl, K. and Diseases, E. A. B. o. C. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2015, 17: 606-613.

Hata, T., Aikoh, T., Hirokawa, M. and Hosoda, M. Mycosis fungoides with involvement of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998, 27: 127-8.

Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., Hendrikx, J., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A., Werb, Z., Lyden, D. and Rafii, S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002, 8: 841-9.

Heading, K. L., Brockley, L. K. and Bennett, P. F. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002-07). *Aust Vet J* 2011, 89: 109-16.

Heidaran, M. A., Pierce, J. H., Yu, J. C., Lombardi, D., Artrip, J. E., Fleming, T. P., Thomason, A. and Aaronson, S. A. Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol Chem* 1991, 266: 20232-7.

Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J. and Corless, C. L. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002, 20: 1692-703.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C.-J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D. M., Silberman, S., Dimitrijevic, S. and Fletcher, J. A. Kinase Mutations and Imatinib Response in Patients With Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *J Clin Oncol* 2003, 21: 4342-4349.

Heisig, M., Maj, J., Szepietowski, J. C. and Reich, A. Durable remission of folliculotropic mycosis fungoides achieved with a combined topical treatment with cytarabine and carmustine. *Dermatol Ther* 2016, 29: 15-18.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z. and Rafii, S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002, 109: 625-37.

Heldin, C. H. and Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999, 79: 1283-316.

Heldin, C. H., Westermark, B. and Wasteson, A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76: 3722-6.

Hendrick, M. J. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J Am Vet Med Assoc* 1998, 213: 1425-6.

Hendrick, M. J. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Invest* 1999, 17: 273-7.

Hendrick, M. J. and Brooks, J. J. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1994, 31: 126-9.

Hendrick, M. J. and Dunagan, C. A. Focal necrotizing granulomatous panniculitis

associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). J Am Vet Med Assoc 1991, 198: 304-5.

Hendrick, M. J. and Goldschmidt, M. H. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? J Am Vet Med Assoc 1991, 199: 968.

Hendrick, M. J., Goldschmidt, M. H., Shofer, F. S., Wang, Y. Y. and Somlyo, A. P. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. Cancer Res 1992, 52: 5391-4.

Hendrick, M. J., Kass, P. H., McGill, L. D. and Tizard, I. R. Postvaccinal sarcomas in cats. J Natl Cancer Inst 1994a, 86: 341-3.

Hendrick, M. J., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H., Haviland, J. C., Schelling, S. H., Engler, S. J. and Gliatto, J. M. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). J Am Vet Med Assoc 1994b, 205: 1425-9.

Henriksen, R., Funa, K., Wilander, E., Backstrom, T., Ridderheim, M. and Oberg, K. Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. Cancer Res 1993, 53: 4550-4.

Herbst, R., Munemitsu, S. and Ullrich, A. Oncogenic activation of v-kit involves deletion of a putative tyrosine-substrate interaction site. Oncogene 1995, 10: 369-79.

Hershey, A. E., Dubielzig, R. R., Padilla, M. L. and Helfand, S. C. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. Vet Pathol 2005, 42: 805-11.

Hershey, A. E., Sorenmo, K. U., Hendrick, M. J., Shofer, F. S. and Vail, D. M. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). J Am Vet Med Assoc 2000, 216: 58-61.

Hines, S. J., Organ, C., Kornstein, M. J. and Krystal, G. W. Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ* 1995, 6: 769-79.

Hiratsuka, S., Maru, Y., Okada, A., Seiki, M., Noda, T. and Shibuya, M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001, 61: 1207-13.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. and Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 9349-54.

Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M. and Shibuya, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002, 2: 289-300.

Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y. and Kitamura, Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998, 279: 577-80.

Hirschberger, J. and Kessler, M. Das feline Fibrosarkom. *Tierärztliche Praxis* 2001, 29: 66 - 71.

Ho, C. L., Hsu, L. F., Phylly, R. L. and Li, C. Y. Autocrine expression of platelet-derived growth factor B in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 2005, 114: 133-40.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P. and Besmer, P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990, 63: 225-33.

Huang, H. P., Yang, H. L., Liang, S. L., Lien, Y. H. and Chen, K. Y. Iatrogenic hyperadrenocorticism in 28 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999, 35: 200-7.

Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D. J., Langley, K. E., Lyman, S. D. and Bar-Eli, M. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 1996, 13: 2339-47.

Humbert, M., Casteran, N., Letard, S., Hanssens, K., Iovanna, J., Finetti, P., Bertucci, F., Bader, T., Mansfield, C. D., Moussy, A., Hermine, O. and Dubreuil, P. Masitinib combined with standard gemcitabine chemotherapy: in vitro and in vivo studies in human pancreatic tumour cell lines and ectopic mouse model. *PLoS One* 2010, 5: e9430.

Huttinger, C., Hirschberger, J., Jahnke, A., Kostlin, R., Brill, T., Plank, C., Kuchenhoff, H., Krieger, S. and Schillinger, U. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *J Gene Med* 2008, 10: 655-67.

Inoue, M., Kyo, S., Fujita, M., Enomoto, T. and Kondoh, G. Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res* 1994, 54: 3049-53.

Isotani, M., Ishida, N., Tominaga, M., Tamura, K., Yagihara, H., Ochi, S., Kato, R., Kobayashi, T., Fujita, M., Fujino, Y., Setoguchi, A., Ono, K., Washizu, T. and Bonkobara, M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med* 2008, 22: 985-8.

Isotani, M., Tamura, K., Yagihara, H., Hikosaka, M., Ono, K., Washizu, T. and Bonkobara, M. Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 114: 168-72.

Iwamoto, K. S., Bennett, L. R., Norman, A., Villalobos, A. E. and Hutson, C. A. Linoleate produces remission in canine mycosis fungoides. *Cancer Lett* 1992, 64: 17-22.

Jackson, M. L., Wood, S. L., Misra, V. and Haines, D. M. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res* 1996, 60: 199-204.

Jacobs-Helber, S. M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A. and Sawyer, S. T. Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem* 1997, 272: 6850-3.

Jahnke, A., Hirschberger, J., Fischer, C., Brill, T., Kostlin, R., Plank, C., Kuchenhoff, H., Krieger, S., Kamenica, K. and Schillinger, U. Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007, 54: 599-606.

Jas, D., Soyer, C., De Fornel-Thibaud, P., Oberli, F., Vernes, D., Guigal, P. M., Poulet, H. and Devauchelle, P. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials in Vaccinology* 2015, 4: 1-8.

Joo, A., Aburatani, H., Morii, E., Iba, H. and Yoshimura, A. STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression. *Oncogene* 2004, 23: 726-34.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. and Alitalo, K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996, 15: 290-98.

Jourdier, T. M., Moste, C., Bonnet, M. C., Delisle, F., Tafani, J. P., Devauchelle, P., Tartaglia, J. and Moingeon, P. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003, 10: 2126-32.

Kaipainen, A., Korhonen, J., Pajusola, K., Aprelikova, O., Persico, M. G., Terman, B. I. and Alitalo, K. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med* 1993, 178: 2077-88.

Kalat, M., Mayr, B., Schleger, W., Wagner, B. and Reifinger, M. Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci* 1991, 51: 227-8.

Kanazawa, T., Nokubi, M., Takizawa, K., Matsuzawa, S., Shinnabe, A., Mineta, H. and Iino, Y. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha gene expression in laryngeal small cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2010, 124: 1340-3.

Kandel, J., Bossy-Wetzel, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J. and Hanahan, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991, 66: 1095-104.

Kaplan, D. R., Chao, F. C., Stiles, C. D., Antoniades, H. N. and Scher, C. D. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* 1979, 53: 1043-52.

Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., Jeltsch, M., Jackson, D. G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C. and Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004, 5: 74-80.

Kass, P. H., Barnes, W. G., Jr., Spangler, W. L., Chomel, B. B. and Culbertson, M. R. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993, 203: 396-405.

Kass, P. H., Spangler, W. L., Hendrick, M. J., McGill, L. D., Esplin, D. G., Lester, S., Slater, M., Meyer, E. K., Boucher, F., Peters, E. M., Gobar, G. G., Htoo, T. and Decile, K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003, 223: 1283-92.

Katayama, R., Huelsmeyer, M. K., Marr, A. K., Kurzman, I. D., Thamm, D. H. and Vail, D. M. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004, 54: 25-33.

Kawai, T., Hiroi, S. and Torikata, C. Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptors. *Lab Invest* 1997, 77: 431-6.

Keating, M. T. and Williams, L. T. Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in v-sis-transformed cells. *Science* 1988, 239: 914-6.

Kelly, D. F., Halliwell, R. E. and Schwartzman, R. M. Generalized cutaneous eruption in a dog, with histological similarity to human mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 1972, 86: 164-71.

Kent, E. M. Use of an Immunostimulant as an Aid in Treatment and Management of Fibrosarcoma in Three Cats. *Feline Pract* 1993, 21: 13 - 7.

Khanna, C., Lund, E. M., Redic, K. A., Hayden, D. W., Bell, F. W., Goulland, E. L. and Klausner, J. S. Randomized controlled trial of doxorubicin versus dactinomycin in a multiagent protocol for treatment of dogs with malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998, 213: 985-90.

Kidney, B. A., Ellis, J. A., Haines, D. M. and Jackson, M. L. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 2000, 61: 1037-41.

Kidney, B. A., Ellis, J. A., Haines, D. M. and Jackson, M. L. Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2001a, 62: 1990-4.

Kidney, B. A., Haines, D. M., Ellis, J. A., Burnham, M. and Jackson, M. L. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001b, 62: 828-32.

Kidney, B. A., Haines, D. M., Ellis, J. A., Burnham, M. L. and Jackson, M. L. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res* 2002, 63: 60-3.

Kidney, B. A., Haines, D. M., Ellis, J. A., Burnham, M. L., Teifke, J. P., Czerwinski, G. and Jackson, M. L. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001c, 62: 833-9.

Kilvaer, T. K., Valkov, A., Sorbye, S., Smeland, E., Bremnes, R. M., Busund, L. T. and Donnem, T. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One* 2010, 5: e15368.

Kim, E. J., Hess, S., Richardson, S. K., Newton, S., Showe, L. C., Benoit, B. M., Ubriani, R., Vittorio, C. C., Junkins-Hopkins, J. M., Wysocka, M. and Rook, A. H. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005, 115: 798-812.

Kimura, A., Katoh, O., Hyodo, H., Kuramoto, A. and Satow, Y. Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 1995, 18: 237-42.

Kimura, Y., Jones, N., Kluppel, M., Hirashima, M., Tachibana, K., Cohn, J. B., Wrana, J. L., Pawson, T. and Bernstein, A. Targeted mutations of the

juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 6015-20.

King, G. K., Yates, K. M., Greenlee, P. G., Pierce, K. R., Ford, C. R., McAnalley, B. H. and Tizard, I. R. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995, 31: 439-47.

Kleiter, M., Tichy, A., Willmann, M., Pagitz, M. and Wolfesberger, B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2010, 51: 349-55.

Kliczkowska, K., Jankowska, U., Jagielski, D., Czopowicz, M. and Sapierzyński, R. Epidemiological and morphological analysis of feline injection site sarcomas. *Pol J Vet Sci.* 2015, 18: 313-22.

Knobler, E. Current management strategies for cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Dermatol* 2004, 22: 197-208.

Knowles, D. M. Immunophenotypic and antigen receptor gene rearrangement analysis in T cell neoplasia. *Am J Pathol* 1989, 134: 761-85.

Kobayashi, T., Hauck, M. L., Dodge, R., Page, R. L., Price, G. S., Williams, L. E., Hardie, E. M., Mathews, K. G. and Thrall, D. E. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002, 43: 473-9.

Kourembanas, S., Morita, T., Liu, Y. and Christou, H. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 1997, 51: 438-43.

Kristal, O., Rassnick, K. M., Gliatto, J. M., Northrup, N. C., Chretien, J. D., Morrison-Collister, K., Cotter, S. M. and Moore, A. S. Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *J Vet Intern Med* 2004, 18: 75-80.

Kruh, G. D. and Belinsky, M. G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003, 22: 7537-7552.

Krystal, G. W., Hines, S. J. and Organ, C. P. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* 1996, 56: 370-6.

Kuntz, C. A. and Powers, B. E. Modified wide local excision for vaccine associated soft tissue sarcomas in cats. *Vet Surg* 2000, 29: 481.

Lachowicz, J. L., Post, G. S. and Brodsky, E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005, 19: 860-4.

Ladlow, J. Injection Site-Associated Sarcoma in the Cat: Treatment recommendations and results to date. *J Feline Med Surg* 2013, 15: 409-418.

Lamberg, S. I. and Bunn, P. A., Jr. Cutaneous T-cell lymphomas. Summary of the Mycosis Fungoides Cooperative Group-National Cancer Institute Workshop. *Arch Dermatol* 1979, 115: 1103-5.

Lana, S. E., Jackson, T. L., Burnett, R. C., Morley, P. S. and Avery, A. C. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2006, 20: 329-34.

Lasota, J., Jasinski, M., Sarlomo-Rikala, M. and Miettinen, M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999, 154: 53-60.

Lasota, J. and Miettinen, M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006, 23: 91-102.

Lassam, N. and Bickford, S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 1992, 7: 51-6.

Lawrence, J., Saba, C., Gogal, R., Jr., Lamberth, O., Vandenplas, M. L., Hurley, D. J., Dubreuil, P., Hermine, O., Dobbin, K. and Turek, M. Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Vet Comp Oncol* 2012, 10: 143-54.

Leal, F., Williams, L. T., Robbins, K. C. and Aaronson, S. A. Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science* 1985, 230: 327-30.

LeBoit, P. E. Variants of mycosis fungoides and related cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Diagn Pathol* 1991, 8: 73-81.

Lemarié, S. L. and Eddlestone, S. M. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with dacarbazine in a dog. *Vet Dermatol* 1997, 8: 41-6.

Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* 2010, 141: 1117-1134.

Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. and Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005, 23: 16-43.

Lester, S., Clemett, T. and Burt, A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996, 32: 91-5.

Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmerini, F., Leventhal, P. S., Guery, S., Moussy, A., Kinet, J. P., Hermine, O. and Dubreuil, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res* 2008, 6: 1137-45.

Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. and Betsholtz, C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994, 8: 1875-87.

Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88: 323-31.

Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991, 351: 453-6.

Li, X. and Eriksson, U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, 14: 91-8.

Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Alitalo, K., Ostman, A. and Eriksson, U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 302-9.

Liang, J., Wu, Y.-L., Chen, B.-J., Zhang, W., Tanaka, Y. and Sugiyama, H. The C-Kit Receptor-Mediated Signal Transduction and Tumor-Related Diseases. *Int J Biol Sci* 2013, 9: 435-443.

Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M. and London, C. A. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2002, 100: 585-93.

Lidbetter, D. A., Williams, F. A., Jr., Krahwinkel, D. J. and Adams, W. H. Radical lateral body-wall resection for fibrosarcoma with reconstruction using polypropylene mesh and a caudal superficial epigastric axial pattern flap: a prospective clinical study of the technique and results in 6 cats. *Vet Surg* 2002, 31: 57-64.

Lindhahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P. and Betsholtz, C. Pericyte loss and

microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997, 277: 242-5.

Liu, L., Cutler, R. L., Mui, A. L. and Krystal, G. Steel factor stimulates the serine/threonine phosphorylation of the interleukin-3 receptor. *J Biol Chem* 1994, 269: 16774-9.

Liu, P., Ying, Y., Ko, Y. G. and Anderson, R. G. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem* 1996, 271: 10299-303.

Liu, X. H., Bai, C. G., Xie, Q., Feng, F., Xu, Z. Y. and Ma, D. L. Prognostic value of KIT mutation in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2005, 11: 3948-52.

Logan, A., Frautschy, S. A. and Baird, A. Basic fibroblast growth factor and central nervous system injury. *Ann N Y Acad Sci* 1991, 638: 474-6.

London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D. and Hershey, B. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia) in solid tumours. *Vet Comp Oncol* 2012, 10: 194 - 205.

London, C. A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med* 2009, 24: 106-12.

London, C. A. Small Molecule Inhibitors in Veterinary Oncology Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2014, 44: 893-908.

London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C. and Geissler, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999, 27: 689-97.

London, C. A., Gardner, H. L., Mathie, T., Stingle, N., Portela, R., Pennell, M. L.,

Clifford, C. A., Rosenberg, M. P., Vail, D. M., Williams, L. E., Cronin, K. L., Wilson-Robles, H., Borgatti, A., Henry, C. J., Bailey, D. B., Locke, J., Northrup, N. C., Crawford-Jakubiak, M., Gill, V. L., Klein, M. K., Ruslander, D. M., Thamm, D. H., Phillips, B. and Post, G. Impact of Toceranib/Piroxicam/Cyclophosphamide Maintenance Therapy on Outcome of Dogs with Appendicular Osteosarcoma following Amputation and Carboplatin Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. PLoS One 2015, 10: e0124889.

London, C. A., Hannah, A. L., Zadovoskaya, R., Chien, M. B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G. and Cherrington, J. M. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. Clin Cancer Res 2003, 9: 2755-68.

London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Follis, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P., Henry, C. J., Mitchener, K. L., Klein, M. K., Hintermeister, J. G., Bergman, P. J., Couto, G. C., Mauldin, G. N. and Michels, G. M. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. Clin Cancer Res 2009, 15: 3856-65.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A., Hajjar, K. A., Manova, K., Benezra, R. and Rafii, S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat Med 2001, 7: 1194-201.

Lyles, S. E., Milner, R. J., Kow, K. and Salute, M. E. In vitro effects of the tyrosine kinase inhibitor, masitinib mesylate, on canine hemangiosarcoma cell lines. Vet Comp Oncol 2012, 10: 223-235.

Lyman, S. D. and Jacobsen, S. E. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell

factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998, 91: 1101-34.

Ma, Y., Longley, B. J., Wang, X., Blount, J. L., Langley, K. and Caughey, G. H. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 1999, 112: 165-70.

Macy, D. W. Vaccine adjuvants. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997, 12: 206-11.

Macy, D. W. and Hendrick, M. J. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996, 26: 103-9.

Madewell, B. R., Griffey, S. M., McEntee, M. C., Leppert, V. J. and Munn, R. J. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol* 2001, 38: 196-202.

Magnol, J. P., Ghernati, I., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A. and Fournel, C. [Clinical, morphologic and immunophenotypic data based on 10 cases of canine muco-cutaneous epidermotropic T-lymphoma (analogous to Mycosis Fungoide). Important of an animal model of spontaneous pathology]. *Bull Acad Natl Med* 1996, 180: 449-62.

Mahon, F.-X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J. M. and Melo, J. V. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003, 101: 2368-2373.

Majumder, S., Ray, P. and Besmer, P. Tyrosine protein kinase activity of the HZ4-feline sarcoma virus P80gag-kit-transforming protein. *Oncogene Res* 1990, 5: 329-35.

Makinen, T., Jussila, L., Veikkola, T., Karpanen, T., Kettunen, M. I., Pulkkanen, K. J., Kauppinen, R., Jackson, D. G., Kubo, H., Nishikawa, S., Yla-Herttuala, S.

and Alitalo, K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001, 7: 199-205.

Malone, E. K., Rassnick, K. M., Wakshlag, J. J., Russell, D. S., Al-Sarraf, R., Ruslander, D. M., Johnson, C. S. and Trump, D. L. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2010, 8: 209-20.

Mandriota, S. J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D. G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G. and Pepper, M. S. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001, 20: 672-82.

Maniscalco, L., Iussich, S., Morello, E., Martano, M., Biolatti, B., Riondato, F., Salda, L. D., Romanucci, M., Malatesta, D., Bongiovanni, L., Tirrito, F., Gattino, F., Buracco, P. and De Maria, R. PDGFs and PDGFRs in canine osteosarcoma: New targets for innovative therapeutic strategies in comparative oncology. *Vet J* 2013, 195: 41-47.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002, 298: 1912-34.

Marech, I., Patruno, R., Zizzo, N., Gadaleta, C., Introna, M., Zito, A. F., Gadaleta, C. D. and Ranieri, G. Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: Where we are? *Crit Rev Oncol Hematol* 91: 98-111.

Martano, M., Morello, E. and Buracco, P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J* 2011, 188: 136-41.

Martano, M., Morello, E., Ughetto, M., Iussich, S., Petterino, C., Cascio, P. and Buracco, P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005, 170: 84-90.

Martinho, O., Longatto-Filho, A., Lambros, M. B., Martins, A., Pinheiro, C., Silva, A., Pardal, F., Amorim, J., Mackay, A., Milanezi, F., Tamber, N., Fenwick, K., Ashworth, A., Reis-Filho, J. S., Lopes, J. M. and Reis, R. M. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer* 2009, 101: 973-82.

Martins-Green, M., Boudreau, N. and Bissell, M. J. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res* 1994, 54: 4334-41.

Matei, D., Chang, D. D. and Jeng, M. H. Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor alpha and Akt inactivation. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 681-90.

Matei, D., Emerson, R. E., Lai, Y. C., Baldrige, L. A., Rao, J., Yiannoutsos, C. and Donner, D. D. Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene* 2006, 25: 2060-9.

Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001, 2001: re21.

Mayer, M. N., Treuil, P. L. and LaRue, S. M. Radiotherapy and surgery for feline soft tissue sarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 2009, 50: 669-72.

Mayr, B., Blauensteiner, J., Edlinger, A., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G. and Brem, G. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res Vet Sci* 2000, 68: 63-70.

Mayr, B., Bockstahler, B., Loupal, G., Reifinger, M. and Schlegel, W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci* 1996, 61: 268-70.

Mayr, B., Eschborn, U. and Kalat, M. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991, 38: 617-20.

Mayr, B., Hofstadler, E., Schleger, W., Reifinger, M. and Eisenmenger, E. Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994, 41: 197-201.

Mayr, B., Reifinger, M., Alton, K. and Schaffner, G. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun* 1998, 22: 249-55.

Mayr, B., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Schneider, A., Reifinger, M. and Loupal, G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J* 1995, 151: 707-13.

McEntee, M. C. and Page, R. L. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001, 15: 176-82.

McLeod, D. A. and Thrall, D. E. The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. A review. *Vet Surg* 1989, 18: 1-6.

McNiel, E. A. Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model. *Clin Orthop Relat Res* 2001: 21-7.

Mehrany, K., El-Azhary, R. A., Bouwhuis, S. A. and Pittelkow, M. R. Cutaneous T-cell lymphoma and atopy: is there an association? *Br J Dermatol* 2003, 149: 1013-7.

Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Carver, J., Chan, E., Moss, K. G., Haznedar, J. O., Sukbuntherng, J., Blake, R. A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G. and Cherrington, J. M. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular

endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 327-37.

Mielke, V., Wolff, H. H., Winzer, M. and Sterry, W. Localized and disseminated pagetoid reticulosis. Diagnostic immunophenotypical findings. *Arch Dermatol* 1989, 125: 402-6.

Millanta, F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D. and Poli, A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 2006, 81: 350-7.

Miller, R. L., Van Lelyveld, S., Warland, J., Dobson, J. M. and Foale, R. D. A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. *Vet Comp Oncol* 2014: n/a-n/a.

Mir, L. M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., Delisle, F., Doliger, S., Fradelizi, D., Belehradek, J., Jr. and Orlowski, S. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1997, 76: 1617-22.

Mitchell, L., Thamm, D. H. and Biller, B. J. Clinical and Immunomodulatory Effects of Toceranib Combined with Low-Dose Cyclophosphamide in Dogs with Cancer. *J Vet Intern Med* 2012, 26: 355-362.

Mitry, E., Hammel, P., Deplanque, G., Mornex, F., Levy, P., Seitz, J. F., Moussy, A., Kinet, J. P., Hermine, O., Rougier, P. and Raymond, E. Safety and activity of masitinib in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, 66: 395-403.

Moore, A. S., London, C. A., Wood, C. A., Williams, L. E., Cotter, S. M., L'Heureux, D. A. and Frimberger, A. E. Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med* 1999, 13: 395-8.

Moore, P. F., Affolter, V. K., Graham, P. S. and Hirt, B. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. *Vet Dermatol* 2009, 20: 569-76.

Moore, P. F., Olivry, T. and Naydan, D. Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. *Am J Pathol* 1994, 144: 421-9.

Moore, P. F., Rossitto, P. V. and Danilenko, D. M. Canine leukocyte integrins: characterization of a CD18 homologue. *Tissue Antigens* 1990, 36: 211-20.

Moore, P. F., Rossitto, P. V., Danilenko, D. M., Wielenga, J. J., Raff, R. F. and Severns, E. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens* 1992, 40: 75-85.

Morges, M. A., Burton, J. H., Saba, C. F., Vail, D. M., Burgess, K. E. and Thamm, D. H. Phase II Evaluation of VDC-1101 in Canine Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Vet Intern Med* 2014, 28: 1569-1574.

Mori, S., Heldin, C. H. and Claesson-Welsh, L. Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J Biol Chem* 1992, 267: 6429-34.

Mori, S., Heldin, C. H. and Claesson-Welsh, L. Ligand-induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling. *J Biol Chem* 1993, 268: 577-83.

Mori, S., Tanaka, K., Omura, S. and Saito, Y. Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *J Biol Chem* 1995, 270: 29447-52.

Morrison, W. B. (2001) *Cancer in Dogs and Cats, Medical and Surgical Management*, edn. Teton NewMedia, Jackson, WY.

Morrison, W. B. and Starr, R. M. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 2001, 218: 697-702.

Motro, B., Wojtowicz, J. M., Bernstein, A. and van der Kooy, D. Steel mutant mice are deficient in hippocampal learning but not long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 1808-13.

Mucha, D., Laberke, S., Meyer, S. and Hirschberger, J. Lack of association between p53 SNP and FISS in a cat population from Germany. *Vet Comp Oncol* 2014, 12: 130-137.

Muehling, B. M., Toelkes, S., Schelzig, H., Barth, T. F. and Sunder-Plassmann, L. Tyrosine kinase expression in pulmonary metastases and paired primary tumors. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010, 10: 228-31.

Müller-Deile, J., Worthmann, K., Saleem, M., Tossidou, I., Haller, H. and Schiffer, M. The balance of autocrine VEGF-A and VEGF-C determines podocyte survival. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009, 297: F1656-67.

Munday, J. S., Banyay, K., Aberdein, D. and French, A. F. Development of an Injection Site Sarcoma Shortly after Meloxicam Injection in an Unvaccinated Cat. *J Feline Med Surg* 2011, 13: 988-991.

Murphy, K. M. and Olivry, T. Comparison of T-lymphocyte proliferation in canine epitheliotropic lymphosarcoma and benign lymphocytic dermatoses. *Vet Dermatol* 2000, 11: 99-105.

Nagata, H., Worobec, A. S., Oh, C. K., Chowdhury, B. A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y. and Metcalfe, D. D. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of

patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92: 10560-4.

Nambiar, P. R., Haines, D. M., Ellis, J. A., Kidney, B. A. and Jackson, M. L. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2000, 61: 1277-81.

Nambiar, P. R., Jackson, M. L., Ellis, J. A., Chelack, B. J., Kidney, B. A. and Haines, D. M. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2001, 38: 236-8.

Natali, P. G., Nicotra, M. R., Digiesi, G., Cavaliere, R., Bigotti, A., Trizio, D. and Segatto, O. Expression of gp185HER-2 in human cutaneous melanoma: implications for experimental immunotherapeutics. *Int J Cancer* 1994, 56: 341-6.

Nieto, A., Sanchez, M. A., Martinez, E. and Rollan, E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2003, 40: 651-8.

Nolan, M. W., Griffin, L. R., Custis, J. T. and LaRue, S. M. Stereotactic body radiation therapy for treatment of injection-site sarcomas in cats: 11 cases (2008–2012). *J Am Vet Med Assoc* 2013, 243: 526-531.

Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashima, T., Yamashita, J. and Yamamoto, H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995, 270: 28316-24.

Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A. and Salomon, D. S. The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci* 2001, 6: D685-707.

Noronha, E. J., Sterling, K. H. and Calame, K. L. Increased expression of Bcl-xL and c-Myc is associated with transformation by Abelson murine leukemia virus. *J*

Biol Chem 2003, 278: 50915-22.

Oliver, G. and Detmar, M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002, 16: 773-83.

Oriss, T. B., Krishnamoorthy, N., Ray, P. and Ray, A. Dendritic cell c-kit signaling and adaptive immunity: implications for the upper airways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014, 14: 7-12.

Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S. H., Ehrlich, M. and Basilico, C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 5672-7.

Palmqvist, L., Glover, C. H., Hsu, L., Lu, M., Bossen, B., Piret, J. M., Humphries, R. K. and Helgason, C. D. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem Cells* 2005, 23: 663-80.

Pancake, B. A., Zucker-Franklin, D. and Coutavas, E. E. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest* 1995, 95: 547-54.

Paterson, J., Tedoldi, S., Craxton, A., Jones, M., Hansmann, M., Collins, G., Robertson, H., Natkunam, Y., Pileri, S., Campo, E., Clark, E., Mason, D. and Marafioti, T. The differential expression of LCK and BAFF-receptor and their role in apoptosis in human lymphomas. *Haematologica* 2006, 91: 772-780.

Patrino, R., Arpaia, N., Gadaleta, C. D., Passantino, L., Zizzo, N., Misino, A., Lucarelli, N. M., Catino, A., Valerio, P., Ribatti, D. and Ranieri, G. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* 2009, 13: 555-561.

Pech, M., Gazit, A., Arnstein, P. and Aaronson, S. A. Generation of fibrosarcomas in vivo by a retrovirus that expresses the normal B chain of platelet-derived growth factor and mimics the alternative splice pattern of the v-sis oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 2693-7.

Pellegata, N. S., Antoniono, R. J., Redpath, J. L. and Stanbridge, E. J. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 15209-14.

Perosio, P. M. and Brooks, J. J. Expression of growth factors and growth factor receptors in soft tissue tumors. Implications for the autocrine hypothesis. *Lab Invest* 1989, 60: 245-53.

Petterino, C., Martano, M., Cascio, P., Cerruti, F., Martini, M., Morello, E., Bruno, R., Castagnaro, M. and Buracco, P. Immunohistochemical study of STAT3 expression in feline injection-site fibrosarcomas. *J Comp Pathol* 2006, 134: 91-100.

Phelps, H. A., Kuntz, C. A., Milner, R. J., Powers, B. E. and Bacon, N. J. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2011, 239: 97-106.

Piatkowska-Jakubas, B., Krawczyk-Kulis, M., Giebel, S., Adamczyk-Cioch, M., Czyz, A., Lech Maranda, E., Paluszewska, M., Palynyczko, G., Piszcz, J. and Holowiecki, J. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Pol Arch Med Wewn* 2008, 118: 664-9.

Pinto, A., Gloghini, A., Gattei, V., Aldinucci, D., Zagonel, V. and Carbone, A. Expression of the c-kit receptor in human lymphomas is restricted to Hodgkin's disease and CD30+ anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 1994, 83: 785-792.

Poirier, V. J., Thamm, D. H., Kurzman, I. D., Jeglum, K. A., Chun, R., Obradovich, J. E., O'Brien, M., Fred, R. M., 3rd, Phillips, B. S. and Vail, D. M.

Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002, 16: 726-31.

Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M. L. and Fournel-Fleury, C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 2010, 47: 414-33.

Porta, C., Paglino, C., Imarisio, I. and Bonomi, L. Uncovering Pandora's vase: the growing problem of new toxicities from novel anticancer agents. The case of sorafenib and sunitinib. *Clin Exp Med* 2007, 7: 127-34.

Price, G. S., Page, R. L., Fischer, B. M., Levine, J. F. and Gerig, T. M. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J Vet Intern Med* 1991, 5: 259-62.

Price, R. L., Haley, S. T., Bullard, T. A., Goldsmith, E. C., Simpson, D. G., Thielen, T. E., Yost, M. J. and Terracio, L. Effects of platelet-derived growth factor-AA and -BB on embryonic cardiac development. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 2003, 272A: 424-433.

Pryer, N. K., Lee, L. B., Zadovaskaya, R., Yu, X., Sukbuntherng, J., Cherrington, J. M. and London, C. A. Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 5729-34.

Quintin-Colonna, F., Devauchelle, P., Fradelizi, D., Mourot, B., Faure, T., Kourilsky, P., Roth, C. and Mehtali, M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996, 3: 1104-12.

Rahaman, S. O., Harbor, P. C., Chernova, O., Barnett, G. H., Vogelbaum, M. A.

and Haque, S. J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002, 21: 8404-13.

Raines, E. W. and Ross, R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 1982, 257: 5154-60.

Ralfkiaer, E. Immunohistological markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol* 1991, 8: 62-72.

Rassidakis GZ, G. G., Oyarzo M, Younes A, Medeiros LJ. Lack of c-kit (CD117) expression in CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol* 2004, 17: 946-53.

Rassnick, K. M., Rodriguez, C. O., Khanna, C., Rosenberg, M. P., Kristal, O., Chaffin, K. and Page, R. L. Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2006, 67: 517-23.

Rawlings, N. G., Simko, E., Bebachuk, T., Caldwell, S. J. and Singh, B. Localization of integrin alpha(v)beta3 and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog. *Histol Histopathol* 2003, 18: 819-26.

Real, P. J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J. C., Lopez-Vega, J. M. and Fernandez-Luna, J. L. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 2002, 21: 7611-8.

Reber, L., Da Silva, C. A. and Frossard, N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2006, 533: 327-340.

Rechner, K. N., Weeks, K. J. and Pruitt, A. F. Total skin electron therapy

technique for the canine patient. *Vet Radiol Ultrasound* 2011, 52: 345-352.

Reith, A. D., Rottapel, R., Giddens, E., Brady, C., Forrester, L. and Bernstein, A. W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev* 1990, 4: 390-400.

Restucci, B., Borzacchiello, G., Maiolino, P., Martano, M., Paciello, O. and Papparella, S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2004, 130: 99-104.

Restucci, B., Maiolino, P., Paciello, O., Martano, M., De Vico, G. and Papparella, S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol* 2003, 128: 252-9.

Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P. and De Vico, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2002, 39: 488-93.

Risbon, R. E., de Lorimier, L. P., Skorupski, K., Burgess, K. E., Bergman, P. J., Carreras, J., Hahn, K., Leblanc, A., Turek, M., Impellizeri, J., Fred, R., 3rd, Wojcieszyn, J. W., Drobatz, K. and Clifford, C. A. Response of canine cutaneous epitheliotropic lymphoma to lomustine (CCNU): a retrospective study of 46 cases (1999-2004). *J Vet Intern Med* 2006, 20: 1389-97.

Robat, C., London, C., Bunting, L., McCartan, L., Stingle, N., Selting, K., Kurzman, I. and Vail, D. M. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia(R)) in dogs: a phase I dose-finding study(*). *Vet Comp Oncol* 2011:

Rodt, S. A., Ahlen, K., Berg, A., Rubin, K. and Reed, R. K. A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. *J Physiol* 1996, 495 (Pt 1): 193-200.

Romanelli, G., Marconato, L., Olivero, D., Massari, F. and Zini, E. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *J Am Vet Med Assoc* 2008, 232: 1193-9.

Rönstrand, L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61: 2535-48.

Rosenthal, A., Lindquist, P. B., Bringman, T. S., Goeddel, D. V. and Derynck, R. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. *Cell* 1986, 46: 301-9.

Roskoski, R., Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005a, 337: 1-13.

Roskoski, R., Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005b, 338: 1307-15.

Rossi, P. Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. *Int. J. Dev. Biol.* 2013, 57: 179-84.

Rubin, K., Tingstrom, A., Hansson, G. K., Larsson, E., Rönstrand, L., Klareskog, L., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H., Fellstrom, B. and Terracio, L. Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet* 1988, 1: 1353-6.

Rudmann, D. G., Van Alstine, W. G., Doddy, F., Sandusky, G. E., Barkdull, T. and Janovitz, E. B. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. *Vet Pathol* 1996, 33: 466-9.

Rupp, E., Siegbahn, A., Rönstrand, L., Wernstedt, C., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C. H. A unique autophosphorylation site in the platelet-derived growth factor α receptor from a heterodimeric receptor complex. *Eur J Biochem*

1994, 225: 29-41.

Saban, R. Angiogenic factors, bladder neuroplasticity and interstitial cystitis—new pathobiological insights. *Translational Andrology and Urology* 2015, 4: 555-562.

Sabattini, S., Frizzon, M. G., Gentilini, F., Turba, M. E., Capitani, O. and Bettini, G. Prognostic Significance of Kit Receptor Tyrosine Kinase Dysregulations in Feline Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* 2013, 50: 797-805.

Sachinidis, A., Locher, R., Hoppe, J. and Vetter, W. The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms. *FEBS Lett* 1990, 275: 95-8.

Safran, N., Perk, K., Eyal, O. and Dahlberg, J. E. Isolation and preliminary characterisation of a novel retrovirus isolated from a leukaemic dog. *Res Vet Sci* 1992, 52: 250-5.

Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M. J. and Alitalo, K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004, 25: 387-95.

Samaniego, F., Markham, P. D., Gendelman, R., Watanabe, Y., Kao, V., Kowalski, K., Sonnabend, J. A., Pintus, A., Gallo, R. C. and Ensoli, B. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol* 1998, 152: 1433-43.

Sandler, I., Teeger, M. and Best, S. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Can Vet J* 1997, 38: 374.

Santoro, D., Marsella, R. and Hernandez, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. *Vet Dermatol* 2007, 18: 101-6.

Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shitara, K., Nakahata, T. and Shibuya, M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001, 97: 785-91.

Schuh, A. C., Keating, S. J., Montecarlo, F. S., Vogt, P. K. and Breitman, M. L. Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature* 1990, 346: 756-60.

Scott, D. (2000) *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. 1552

Seguin, B. Injection site sarcomas in cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002, 17: 168-73.

Seigneurin, D. and Guillaud, P. [Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker]. *Pathol Biol (Paris)* 1991, 39: 1020-8.

Selheim, F., Fukami, M. H., Holmsen, H. and Vassbotn, F. S. Platelet-derived-growth-factor-induced signalling in human platelets: phosphoinositide-3-kinase-dependent inhibition of platelet activation. *Biochem J* 2000, 350 Pt 2: 469-75.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995, 376: 62-6.

Shapiro, P. E. and Pinto, F. J. The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes.

Am J Surg Pathol 1994, 18: 645-67.

Shaw, S. C., Kent, M. S., Gordon, I. K., Collins, C. J., Greasby, T. A., Beckett, L. A., Hammond, G. M. and Skorupski, K. A. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). J Am Vet Med Assoc 2009, 234: 376-80.

Shibuya, M. and Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res 2006, 312: 549-60.

Shimizu, A., O'Brien, K. P., Sjoblom, T., Pietras, K., Buchdunger, E., Collins, V. P., Heldin, C. H., Dumanski, J. P. and Ostman, A. The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type I α 1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. Cancer Res 1999, 59: 3719-23.

Shiomitsu, K., Bauer, R. W., Grasperge, B. J., Suter, S. E. and Waite, K. J. Cutaneous epitheliotropic lymphoma with dual CD3 and c-kit expression in a dog. Vet Clin Pathol 2012, 41: 594-598.

Siddiqui, M. A. and Scott, L. J. Imatinib: a review of its use in the management of gastrointestinal stromal tumours. Drugs 2007, 67: 805-20.

Simon, M.-P., Navarro, M., Roux, D. and Pouyssegur, J. Structural and functional analysis of a chimeric protein COL1A1-PDGFB generated by the translocation t(17;22)(q22;q13.1) in Dermatofibrosarcoma Protuberans (DP). Oncogene 2001, 20: 2965-75.

Simon, M. P., Pedoutour, F., Sirvent, N., Grosgeorge, J., Minoletti, F., Coindre, J. M., Terrier-Lacombe, M. J., Mandahl, N., Craver, R. D., Blin, N., Sozzi, G., Turc-Carel, C., O'Brien, K. P., Kedra, D., Fransson, I., Guilbaud, C. and Dumanski, J. P. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell

fibroblastoma. *Nat Genet* 1997, 15: 95-8.

Singer, S., Rubin, B. P., Lux, M. L., Chen, C. J., Demetri, G. D., Fletcher, C. D. and Fletcher, J. A. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002, 20: 3898-905.

Skobe, M., Hamberg, L. M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G. L., Alitalo, K. and Detmar, M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001a, 159: 893-903.

Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. and Detmar, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001b, 7: 192-8.

Smith, A. J., Njaa, B. L. and Lamm, C. G. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. *Vet Pathol* 2009, 46: 934-9.

Smith, J. S., Wang, X. Y., Qian, J., Hosek, S. M., Scheithauer, B. W., Jenkins, R. B. and James, C. D. Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000, 59: 495-503.

Smits, A. and Funa, K. Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol* 1998, 13: 511-20.

Smrkovski, O. A., Essick, L., Rohrbach, B. W. and Legendre, A. M. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2015, 13: 314-321.

Sorensen, K. C., Kitchell, B. E., Schaeffer, D. J. and Mardis, P. E. Expression of

matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2004, 65: 373-9.

Soriano, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994, 8: 1888-96.

Sorkin, A., Westermarck, B., Heldin, C. H. and Claesson-Welsh, L. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor. *J Cell Biol* 1991, 112: 469-78.

Souza, C. H. M. and Kitchell, B. E. The role of retinoids in cancer therapy: a literature review. *Vet Cancer Soc Newsletter* 2002, 26: 6-8.

Spugnini, E. P., Baldi, A., Vincenzi, B., Bongiorno, F., Bellelli, C., Citro, G. and Porrello, A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007, 59: 375-81.

Spugnini, E. P., Renaud, S. M., Buglioni, S., Carocci, F., Dragonetti, E., Murace, R., Cardelli, P., Vincenzi, B., Baldi, A. and Citro, G. Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: an approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. *J Transl Med* 2011, 9: 152.

Srivastav, A., Kass, P. H., McGill, L. D., Farver, T. B. and Kent, M. S. Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2012, 241: 595-602.

Stacker, S. A., Williams, R. A. and Achen, M. G. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* 2004, 112: 539-49.

Sui, X., Krantz, S. B., You, M. and Zhao, Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded

erythropoiesis. *Blood* 1998, 92: 1142-9.

Sum, S. O., Hensel, P., Rios, L., Brown, S., Howerth, E. W., Driskell, E. A., Moussy, A., Hermine, O. and Brown, C. A. Drug-induced minimal change nephropathy in a dog. *J Vet Intern Med* 2010, 24: 431-5.

Sundberg, C., Branting, M., Gerdin, B. and Rubin, K. Tumor cell and connective tissue cell interactions in human colorectal adenocarcinoma. Transfer of platelet-derived growth factor-AB/BB to stromal cells. *Am J Pathol* 1997, 151: 479-92.

Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J. and Linnoila, R. I. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 1996, 56: 305-15.

Takahashi, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull* 2011, 34: 1785-8.

Takanosu, M., Amano, S. and Kagawa, Y. Analysis of c-KIT exon 11 mutations in canine gastrointestinal stromal tumours. *Vet J* 2016, 207: 118-123.

Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H. and Kitamura, Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999, 59: 4297-300.

Taylor, M. L. and Metcalfe, D. D. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000, 14: 517-35.

Thamm, D. H., Rose, B., Kow, K., Humbert, M., Mansfield, C. D., Moussy, A., Hermine, O. and Dubreuil, P. Masitinib as a chemosensitizer of canine tumor cell lines: A proof of concept study. *Vet J* 2011:

Thomas, R., Valli, V. E., Ellis, P., Bell, J., Karlsson, E. K., Cullen, J., Lindblad-

Toh, K., Langford, C. F. and Breen, M. Microarray-based cytogenetic profiling reveals recurrent and subtype-associated genomic copy number aberrations in feline sarcomas. *Chromosome Res* 2009, 17: 987-1000.

Tobey, J. C., Houston, D. M., Breur, G. J., Jackson, M. L. and Stubbington, D. A. Cutaneous T-cell lymphoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1994, 204: 606-9.

Trento, E., Castilletti, C., Ferraro, C., Lesnoni La Parola, I., Mussi, A., Muscardin, L., Bordignon, V., D'Agosto, G., Amantea, A., Mastroianni, A., Ameglio, F., Fluhr, J. and Cordiali-Fei, P. Human herpesvirus 8 infection in patients with cutaneous lymphoproliferative diseases. *Arch Dermatol* 2005, 141: 1235-42.

Tsambiras, P. E., Patel, S., Greene, J. N., Sandin, R. L. and Vincent, A. L. Infectious complications of cutaneous t-cell lymphoma. *Cancer Control* 2001, 8: 185-8.

Turek, M., Gogal Jr, R., Saba, C., Vandenplas, M. L., Hill, J., Feldhausser, B. and Lawrence, J. Masitinib mesylate does not enhance sensitivity to radiation in three feline injection-site sarcoma cell lines under normal growth conditions. *Res Vet Sci* 2014, 96: 304-307.

Uhrbom, L., Hesselager, G., Nister, M. and Westermarck, B. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 1998, 58: 5275-9.

Vail, D. M., Chun, R., Thamm, D. H., Garrett, L. D., Cooley, A. J. and Obradovich, J. E. Efficacy of pyridoxine to ameliorate the cutaneous toxicity associated with doxorubicin containing pegylated (Stealth) liposomes: a randomized, double-blind clinical trial using a canine model. *Clin Cancer Res* 1998, 4: 1567-71.

Vail, D. M., Kravis, L. D., Cooley, A. J., Chun, R. and MacEwen, E. G. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997,

39: 410-6.

Vascellari, M., Melchiotti, E. and Mutinelli, F. Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 2006, 43: 545-8.

Vassbotn, F. S., Havnen, O. K., Heldin, C. H. and Holmsen, H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem* 1994, 269: 13874-9.

Veikkola, T., Jussila, L., Makinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T. V., Kubo, H., Thurston, G., McDonald, D. M., Achen, M. G., Stacker, S. A. and Alitalo, K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001, 20: 1223-31.

Vernau, W. and Moore, P. F. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999, 69: 145-64.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992, 70: 523-6.

Vonderheid, Bernengo, Burg, Duvic, Heald, Laroche, Olsen, Pittelkow, Russell-Jones, Takigawa, Willemze and ISCL. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol.* 2002, 46: 95-106.

Wang, C., Luo, Z., Chen, J., Zheng, B., Zhang, R., Chen, Y. and Shi, Y. Target Therapy of Unresectable or Metastatic Dermatofibrosarcoma Protuberans With Imatinib Mesylate: An Analysis on 22 Chinese Patients. *Medicine* 2015, 94: e773.

Wang, Z. and Song, W. [A case of interstitial pneumonia caused by carmustine.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2008, 11: 607-8.

Waterfield, M. D., Scrace, G. T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C. H., Huang, J. S. and Deuel, T. F. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 1983, 304: 35-9.

Weinstock, M. A. and Horm, J. W. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA* 1988, 260: 42-6.

Wergin, M. C. and Kaser-Hotz, B. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. *In Vivo* 2004, 18: 15-9.

White, S. D., Rosychuk, R. A., Scott, K. V., Trettien, A. L., Jonas, L. and Denerolle, P. Use of isotretinoin and etretinate for the treatment of benign cutaneous neoplasia and cutaneous lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993, 202: 387-91.

Wieselthier, J. S. and Koh, H. K. Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol* 1990, 22: 381-401.

Wilcock, B. P. and Yager, J. A. Focal cutaneous vasculitis and alopecia at sites of rabies vaccination in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1986, 188: 1174-7.

Wilcock, B. P. and Yager, J. A. The behavior of epidermotropic lymphoma in twenty-five dogs. *Can Vet J* 1989, 30: 754-6.

Wiles, V., Hohenhaus, A., Lamb, K., Zaidi, B., Camps-Palau, M. and Leibman, N. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg* 2016:

Willemze, R., Jaffe, E. S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S. H., Ralfkiaer, E., Chimenti, S., Diaz-Perez, J. L., Duncan, L. M., Grange, F., Harris, N. L., Kempf, W., Kerl, H., Kurrer, M., Knobler, R., Pimpinelli, N., Sander, C.,

Santucci, M., Sterry, W., Vermeer, M. H., Wechsler, J., Whittaker, S. and Meijer, C. J. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005, 105: 3768-85.

Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S. and et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990, 63: 167-74.

Williams, L. E., Banerji, N., Klausner, J. S., Kapur, V. and Kanjilal, S. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res* 2001, 62: 1354-7.

Williams, L. E., Rassnick, K. M., Power, H. T., Lana, S. E., Morrison-Collister, K. E., Hansen, K. and Johnson, J. L. CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. *J Vet Intern Med* 2006, 20: 136-43.

Witte, O. N. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 1990, 63: 5-6.

Wolking, S., Schaeffeler, E., Lerche, H., Schwab, M. and Nies, A. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet* 2015, 54: 709-735.

Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P. and Lodish, H. F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995, 377: 242-6.

Xie, T. X., Wei, D., Liu, M., Gao, A. C., Ali-Osman, F., Sawaya, R. and Huang, S. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004, 23: 3550-60.

Xue, Y., Lim, S., Yang, Y., Wang, Z., Jensen, L. D. E., Hedlund, E.-M.,

Andersson, P., Sasahara, M., Larsson, O., Galter, D., Cao, R., Hosaka, K. and Cao, Y. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med* 2012, 18: 100-110.

Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Fujimori, H., Sakurai, S., Tanaka, N. and Yamamoto, H. Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 1999, 79: 501-9.

Yancey, M. F., Merritt, D. A., Lesman, S. P., Boucher, J. F. and Michels, G. M. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. *J Vet Pharmacol Ther* 2010a, 33: 162-71.

Yancey, M. F., Merritt, D. A., White, J. A., Marsh, S. A. and Locuson, C. W. Distribution, metabolism, and excretion of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2010b, 33: 154-61.

Yang, J., Liu, X., Nyland, S. B., Zhang, R., Ryland, L. K., Broeg, K., Baab, K. T., Jarbadan, N. R., Irby, R. and Loughran, T. P., Jr. Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway. *Blood* 2010, 115: 51-60.

Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T. L., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E. Y., Schlessinger, J., Francke, U. and Ullrich, A. Human Proto-oncogen c-kit: a New Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase for an Unidentified Ligand. *EMBO J* 1987, 6: 3341-3351.

Yokoyama, Y., Mori, S., Hamada, Y., Hieda, M., Kawaguchi, N., Shaker, M., Tao, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M. and Matsuura, N. Platelet-derived growth factor regulates breast cancer progression via beta-catenin expression. *Pathobiology* 2011, 78: 253-60.

Yoon, S. S., Segal, N. H., Olshen, A. B., Brennan, M. F. and Singer, S.

Circulating angiogenic factor levels correlate with extent of disease and risk of recurrence in patients with soft tissue sarcoma. *Ann Oncol* 2004, 15: 1261-6.

Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M. and Yoshimura, A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002, 196: 641-53.

Zakut, R., Perlis, R., Eliyahu, S., Yarden, Y., Givol, D., Lyman, S. D. and Halaban, R. KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* 1993, 8: 2221-9.

Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D. E. and Inghirami, G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 2002, 21: 1038-47.

Zandvliet, M., Teske, E., Chapuis, T., Fink-Gremmels, J. and Schrickx, J. A. Masitinib reverses doxorubicin resistance in canine lymphoid cells by inhibiting the function of P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther* 2013, 36: 583-587.

Zeiss, C. J., Johnson, E. M. and Dubielzig, R. R. Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium. *Vet Pathol* 2003, 40: 355-62.

Zemke, D., Yamini, B. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. *J Vet Diagn Invest* 2001, 13: 341-5.

Zemke, D., Yamini, B. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 2002, 39: 529-35.

Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J. and Kong, X. P. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 7732-7.

Zizzo, N., Patruno, R., Zito, F. A., Summa, A. D., Tinelli, A., Troilo, S., Misino, A., Ruggieri, E., Goffredo, V., Gadaleta, C. D. and Ranieri, G. Vascular endothelial growth factor concentrations from platelets correlate with tumor angiogenesis and grading in a spontaneous canine non-Hodgkin lymphoma model. *Leuk Lymphoma* 2010, 51: 291-296.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C. and et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990, 63: 213-24.

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mich herzlich in sein Team aufgenommen hat, stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte und mich während der gesamten Arbeit fachlich und menschlich betreute.

Meinen Eltern danke ich von ganzen Herzen, dass sie mir das Studium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht, immer an mich geglaubt und mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben. Auch meinem Bruder und meinen Großeltern möchte ich für all die Unterstützung, die ich durch sie erfahren habe herzlich danken. Reinhard Stüben danke ich für seine Geduld und moralische Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit. Bei Tanja Schmidt bedanke ich mich für ihre Freundschaft, ihr offenes Ohr und ihre schnelle germanistische Hilfe. Alexandra Kurz danke ich mich für die englischen Korrekturen meiner Publikationen. Ganz herzlich möchte ich auch bei meinen Freunden bedanken, die mich durch diese Zeit hinweg immer begleitet haben – ganz besonders bei Imke, Nadin, Thomas, Thilo, Christiane und Esther.

Meinen Kolleginnen Imke Schöpfer, Nicky Bergmann, Miriam Rutz und Daniela Mucha danke ich für ihre Hilfe bei der Akquisition von Patienten. Tina Meichner und Silja Laberke danke ich für die Unterstützung bei den weiterführenden Untersuchungen meiner Patienten, sowie deren fachlicher Hilfe und menschlichen Art. Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team der medizinischen Kleintierklinik München danken.

Ein besonderer Dank geht auch an die Co-Autoren meiner Studien: Prof. Dr. Matti Kiupel, Dr. Martin Kessler, Prof. Dr. Erik Teske und Daniela Betz.